



**Elsa Maria Carvalheiro
Dias** **Desenvolvimento de uma metodologia por
microextração em fase sólida e cromatografia em
fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
(SPME/GC-MS) para detecção de *Helicobacter pylori*
através da utilização de amidas alifáticas**



**Elsa Maria Carvalheiro
Dias**

**Desenvolvimento de uma metodologia por
microextracção em fase sólida e cromatografia em
fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
(SPME/GC-MS) para detecção de *Helicobacter pylori*
através da utilização de amidas alifáticas**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho ao meu filho

o júri

presidente

Prof.^a Dr.^a Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva (orientador)

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço (orientadora)

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar

professora auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

agradecimentos

Agradeço à Doutora Sílvia M. Rocha e ao Doutor Manuel António Coimbra do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela orientação científica, pela paciência e por acreditarem no meu trabalho.

Agradeço à Professora Maria João Vieira do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, pela cedência das culturas de *H. pylori* do isolado clínico.

Agradeço ao Mestre Alexandre Ferreira, à Mestre Isabel Silva, à Dra. Juliana Vinholes, à Dra. Elisabete Coelho e ao Eng. Francisco Antão do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela ajuda e conhecimentos transmitidos.

Agradeço aos colegas e amigos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Infante D. Pedro pelo apoio e amizade.

Agradeço à minha família pela compreensão e apoio prestados.

palavras-chave

Helicobacter pylori; microextração em fase sólida (SPME); cromatografia em fase gasosa (GC), espectrometria de massa (MS), amidas alifáticas, ácidos carboxílicos.

resumo

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa que coloniza o estômago de cerca de metade da população mundial. Em Portugal a prevalência é de cerca de 80%. Esta bactéria está associada ao desenvolvimento de patologias do foro gástrico, como gastrite, úlcera péptica, carcinoma gástrico e linfoma de MALT.

Alguns testes actualmente disponíveis para a detecção da *Helicobacter pylori* são invasivos e desconfortáveis ou são dispendiosos.

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver uma metodologia não invasiva com recurso à microextração em fase sólida acoplada à cromatografia em fase gasosa e à espectrometria de massa (SPME/GC-MS) com vista à detecção da presença da *Helicobacter pylori* através de amidas alifáticas que, em contacto com a bactéria, são convertidas nos ácidos alifáticos correspondentes.

Numa primeira etapa, a metodologia foi optimizada relativamente à fase estacionária, tendo sido estudados três tipos de fibras:

Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/Car/PDMS), Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB) e Poliacrilato (PA). A fase estacionária CW/DVB foi a escolhida pois apresenta a maior eficiência extractiva relativamente aos compostos a analisar: o ácido propiónico e o ácido butírico. Foram feitos ensaios experimentais a partir de uma amidase comercial e de culturas da estirpe de *Helicobacter pylori* J99 obtidas a partir de um isolado clínico de modo a avaliar a formação de ácidos carboxílicos produzidos pelas amidases em presença de amidas alifáticas.

Os resultados obtidos indicam que, após adição de propionamida e/ou de butiramida ao meio contendo a bactéria, ocorre a formação dos respectivos ácidos carboxílicos, por acção da amidase bacteriana sobre as amidas adicionadas. Estes ácidos formados são voláteis passando para a fase de vapor em quantidades que permitem a sua detecção e quantificação por GC-MS.

keywords

Helicobacter pylori; solid phase microextraction (SPME); gas chromatography (GC); mass spectrometry (MS); aliphatic amides, carboxylic acids.

abstract

The *Helicobacter pylori* is a Gram-negative bacterium that colonizes the human stomach of half of the world population. In Portugal, the prevalence is around 80%. This bacterium is associated to the development of gastric pathologies such as gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma, and MALT lymphoma. Some currently available tests for the detection of the *Helicobacter pylori* are uncomfortable, mainly invasive or expensive. A non invasive methodology was developed using a solid phase microextraction and gas chromatography coupled to the mass spectrometry (SPME/GC-MS).

Its aim is the detection of the presence of the *Helicobacter pylori* with aliphatic amides that, when in contact with the bacteria, are converted into the corresponding aliphatic acids.

In a first period, the methodology was optimised relatively to the stationary phase. Three types of fibres were studied:

Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/Car/PDMS), Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB), and Polyacrylate (PA). The stationary phase CW/DVB was chosen because it presents higher extractive efficiency in relation to the compounds under analysis: propionic and butyric acids.

Experimental studies were done with the commercial enzyme amidase and *Helicobacter pylori* J99 cultures of "clinical isolated", as a way to evaluate the formation of carboxylic acids produced by the amidases in presence of aliphatic amides.

The results obtained indicate that, after the addition of propionamide and/or butyramide to the environment containing the bacteria, the formation of the respective carboxylic acids occurs by action of the bacterial amidase to the added amides. The acids formed are volatile, migrating to the vapour phase in quantities that permit their detection and quantification by GC-MS.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| 1.1.1 Patogénese e factores de virulência da <i>H. pylori</i> | 2 |
| 1.1.2 Enzimas da <i>H. pylori</i> que permitem a resistência ao ácido do estômago | 4 |
| 1.1.3 Prevalência da infecção | 5 |
| 1.1.4 Transmissão da infecção | 8 |
| 1.1.5 Métodos de detecção da <i>H. pylori</i> | 10 |
| 1.1.6 Tratamento e prevenção da infecção | 14 |
| 1.2 Microextração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa..... | 15 |
| 1.2.1 Extração em modo de espaço de cabeça | 20 |
| 1.2.2 Influência das condições experimentais | 21 |
| 1.2.3 Análise por GC-MS | 22 |
| 1.3 Objectivos do trabalho | 24 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 25 |
| 2.1 Materiais..... | 27 |
| 2.1.1 Reagentes..... | 27 |
| 2.1.2 Fibras de SPME | 28 |
| 2.1.3 Amidase comercial | 28 |
| 2.1.4 Culturas de <i>H. pylori</i> | 28 |
| 2.2 Desenvolvimento da metodologia de SPME/GC-MS..... | 29 |
| 2.2.1 Selecção da fase estacionária..... | 29 |
| 2.2.2 Análise por GC-MS | 30 |
| 2.2.3 Volume de amostra | 32 |
| 2.3 Implementação da metodologia desenvolvida | 32 |
| 2.3.1 Curvas de calibração | 32 |
| 2.3.2 Ensaios com a amidase comercial | 34 |
| 2.3.3 Ensaios com culturas de <i>H. pylori</i> obtidas a partir de um isolado clínico..... | 35 |
| 2.3.3.1 Estabilidade das amidas à autoclavagem..... | 35 |
| 2.3.3.2 Detecção dos ácidos produzidos pela <i>H. pylori</i> | 36 |
| 2.4 Tratamento de dados | 38 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.1 Desenvolvimento da metodologia de SPME/GC-MS..... | 41 |
| 3.1.1 Critérios para a selecção das amidas..... | 41 |
| 3.1.2 Selecção da fase estacionária..... | 41 |
| 3.1.3 Análise por GC-MS | 44 |
| 3.1.4 Volume de amostra | 45 |
| 3.2 Implementação da metodologia desenvolvida | 47 |
| 3.2.1 Curvas de calibração | 47 |
| 3.2.2 Ensaaios com amidase comercial | 52 |
| 3.2.3 Ensaaios com culturas de <i>H. pylori</i> obtidas a partir de um isolado clínico..... | 53 |
| 3.2.3.1 Estabilidade das amidas à autoclavagem..... | 53 |
| 3.2.3.2 Detecção dos ácidos produzidos pela <i>H. pylori</i> | 54 |
| 4 CONCLUSÕES | 61 |
| 5 BIBLIOGRAFIA | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Helicobacter pylori</i> (adaptado de: http://images.google.pt)..... | 1 |
| Figura 2 - A <i>H. pylori</i> infecta o antro do estômago (adaptado de: http://images.google.pt/) 2 | |
| Figura 3 - Prevalência mundial da <i>H. pylori</i> (adaptado de [15])..... | 6 |
| Figura 4 - Prevalência da infecção por <i>H. pylori</i> em relação à idade, nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento (adaptado de [16])..... | 7 |
| Figura 5 - Vias de transmissão da <i>H. pylori</i> (adaptado de [15])..... | 8 |
| Figura 6 - Seringa de SPME (adaptado de: www.sigmaaldrich.com)..... | 16 |
| Figura 7 - Seringa de SPME e dispositivo da agulha com a fibra exposta (adaptado de [35])..... | 17 |
| Figura 8 - Representação esquemática dos fenómenos de absorção e adsorção dos analitos pela fase estacionária (adaptado [37]). | 19 |
| Figura 9 - Processo de extracção/dessorção dos analitos (adaptado de: www.sigmaaldrich.com)..... | 20 |
| Figura 10 - Diagrama de GC-MS. | 23 |
| Figura 11 - Área cromatográfica dos ácidos em função da fase estacionária usada..... | 42 |
| Figura 12 - Espectro de massa do ácido propiónico de concentração 0,496 g/L. | 44 |
| Figura 13 - Espectro de massa do ácido butírico de concentração 0,479 g/L. | 44 |
| Figura 14 - Cromatograma dos ácidos propiónico e butírico obtido por selecção dos iões m/z 73, 74 e 88..... | 45 |
| Figura 15 - Áreas cromatográficas para os diferentes volumes dos dois ácidos. | 46 |
| Figura 16 - Curva de calibração do ácido propiónico no sistema de SPME de duas fases. 48 | |
| Figura 17 - Curva de calibração do ácido butírico no sistema de SPME de duas fases..... | 48 |
| Figura 18 - Curva de calibração do ácido propiónico no sistema de SPME de três fases... 50 | |
| Figura 19 - Curva de calibração do ácido butírico no sistema de SPME de três fases..... | 50 |
| Figura 20 - Cromatograma do ácido propiónico obtido por hidrólise da propionamida..... | 52 |
| Figura 21 - Cromatograma do ácido butírico obtido por hidrólise da butiramida..... | 53 |
| Figura 22 - Cromatograma obtido após autoclavagem do meio de cultura com a butiramida. | 54 |
| Figura 23 - Cromatograma dos ácidos produzidos a partir de culturas de <i>H. pylori</i> | 55 |
| Figura 24 - Cromatograma em branco obtido após adição das amidas ao meio de cultura. 59 | |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Métodos de detecção da <i>H. pylori</i> | 12 |
| Tabela 2 - Tipos de fibras comercialmente disponíveis pela Sigma Aldrich..... | 18 |
| Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos ácidos..... | 27 |
| Tabela 4 - Condições de análise por GC-MS..... | 31 |
| Tabela 5 - Massa dos ácidos usada para a elaboração das curvas de calibração no sistema de duas fases..... | 33 |
| Tabela 6 - Dados relativos às soluções para análise dos ácidos propiónico e butírico..... | 34 |
| Tabela 7 - Ensaio com culturas de <i>H. pylori</i> | 36 |
| Tabela 8 - Média das áreas cromatográficas obtidas para os dois ácidos utilizando diferentes fases estacionárias..... | 42 |
| Tabela 9 - Áreas cromatográficas dos ácidos e os volumes de solução analisados..... | 46 |
| Tabela 10 - Dados obtidos a partir das curvas de calibração para o sistema de duas fases..... | 49 |
| Tabela 11 - Dados obtidos a partir das curvas de calibração para o sistema de três fases..... | 51 |
| Tabela 12 - Produção de ácido propiónico pela <i>H. pylori</i> após adição de propionamida..... | 56 |
| Tabela 13 - Produção de ácido butírico pela <i>H. pylori</i> após adição de butiramida..... | 57 |

ABREVIATURAS

| Abreviatura | Designação em Inglês | Designação em Português |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ADN | Deoxyribonucleic acid | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ribonucleic acid | Ácido ribonucleico |
| CV | Coefficient of variation | Coeficiente de variação |
| CW | Carbowax | Carbowax |
| DVB | Divinylbenzene | Divinilbenzeno |
| EI | Electronic impact | Impacto electrónico |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay | Ensaio imunoenzimático |
| GC | Gas chromatography | Cromatografia em fase gasosa |
| MS | Mass spectrometry | Espectrometria de massa |
| m/z | Mass to charge ratio | Razão massa carga |
| PA | Polyacrylate | Poliacrilato |
| PCR | Polymerase chain reaction | Reacção em cadeia da polimerase |
| PDMS | Polydimethylsiloxane | Polidimetilsiloxano |
| SIM | Selected ion monitoring | Monitorização de iões seleccionados |
| SPME | Solid phase microextraction | Microextracção em fase sólida |

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Helicobacter pylori*

No início dos anos 80, Barry Marshall e Robin Warren isolaram, pela primeira vez, a *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica de uma paciente com gastrite crónica [1, 2, 3].

Inicialmente, a bactéria foi classificada como *Campylobacter pylori* mas, em 1989, foi incluída num novo género, *Helicobacter*, e reclassificada de *Helicobacter pylori* [1]. Taxonomicamente, pertence ao reino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*. Baseado no conhecimento do seu ARN ribossomal, foi sub-categorizada na classe *Epsilonproteobacteria*, pertence à ordem *Campylobacterales*, ao género *Helicobacteraceae* e à espécie *Helicobacter pylori*.

Existem outras espécies de *Helicobacter* como *H. acinonychis*, *H. aurati*, *H. bilis*, *H. bizzozeronii*, *H. canadensis*, *H. canis*, *H. cholecystus*, *H. cinaedi*, *H. felis*, *H. fennelliae*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. mesocricetorum*, *H. muridarum*, *H. mustelae*, *H. pametensis*, *H. pullorum*, *H. rodentium*, *H. salomonis*, *H. trogonum* e *H. typhlonius* [4].

A *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa, de estrutura encurvada ou espiralada, com superfície lisa e extremidades arredondadas, mede cerca de 2,4 a 4,5 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de diâmetro. Possui 2 a 6 flagelos unipolares com comprimento aproximado de 3 µm (Figura 1) [1, 2, 5].

É uma bactéria microaerofílica, cujo crescimento *in vitro* ocorre na presença de uma concentração óptima de 5% de oxigénio e de uma concentração de dióxido de carbono entre 6 e 10%. A temperatura óptima de crescimento é de 37°C [1, 6].



Figura 1 - *Helicobacter pylori* (adaptado de: <http://images.google.pt>).

1.1.1 Patogénese e factores de virulência da *H. pylori*

A infecção por *H. pylori* está associada ao desenvolvimento de patologias do foro gástrico. É a responsável pela maior causa de gastrite e está associada a úlceras gástricas e duodenais, ao carcinoma gástrico e ao linfoma de MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). Na maioria dos indivíduos infectados ocorrem as gastrites activas que se traduzem na degeneração da superfície epitelial na parte inferior do estômago, o antro (Figura 2) [6].

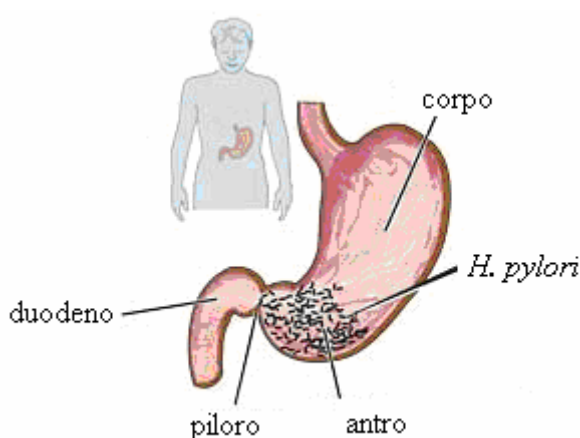


Figura 2 - A *H. pylori* infecta o antro do estômago (adaptado de: <http://images.google.pt/>).

A bactéria desenvolve mecanismos de resistência ao meio ácido do estômago através da produção de amónia. Fixa-se à superfície do estômago, pelas adesinas, e progride na parede do estômago degradando a camada de muco através de lipases e proteases. Além disso, a bactéria move-se facilmente graças à sua forma em espiral e aos flagelos e, assim, atravessa a camada de muco, estabelecendo contacto com as células epiteliais de revestimento. Após a lesão destas células, a bactéria induz uma resposta inflamatória que não é eficaz, porque a produção de enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a arginase, conferem protecção contra a actividade lítica dos macrófagos e dos neutrófilos. Com o decorrer do tempo, as gastrites tornam-se crónicas e com uma maior predisposição para evoluir para as várias patologias gástricas (úlceras gástrica, úlcera duodenal, carcinoma gástrico e Linfoma de MALT) [3,7].

Com base em estudos epidemiológicos, em 1994, a bactéria foi classificada pela *International Agency for Research on Cancer*, um órgão da Organização Mundial de Saúde, como agente cancerígeno do tipo 1 para o cancro do estômago em humanos [2, 8].

A evolução para as diferentes patologias é atribuída à susceptibilidade de cada indivíduo, à sua idade e seus factores genéticos, aos factores ambientais, aos hábitos alimentares e aos factores de virulência (patogenecidade) de cada estirpe de *H. pylori*.

Os factores que têm sido descritos como estando implicados na patogenicidade da *H. pylori* são a proteína imunodominante CagA (*Cytotoxin associated gene A*) e a citotoxina vacuolizante VacA (*Vacuolating cytotoxin*). A proteína CagA, codificada pelo gene *cagA*, é produzida por cerca de 60% das estirpes de *H. pylori*. A citotoxina VacA, codificada pelo gene *vacA* é produzida por cerca de 50% das estirpes. A presença da proteína CagA determina o aumento do estado inflamatório da mucosa gástrica e a citotoxina VacA induz a formação de vacúolos e a estimulação da apoptose nas células epiteliais [9].

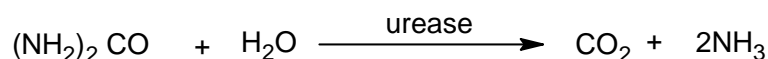
A toxicidade celular está associada à severidade dos sintomas produzidos pela bactéria. Alguns autores referem existir uma relação entre estirpes positivas para o gene *cagA* e o desenvolvimento de carcinoma gástrico [9].

Também tem sido referido que a infecção crónica pode ser influenciada por factores genéticos, como o tipo de grupo sanguíneo. Estudos epidemiológicos mostram existir uma associação entre os antígenos dos grupos sanguíneos ABO e Lewis com a susceptibilidade à colonização pela *H. pylori*, sendo os indivíduos do grupo O os mais susceptíveis [10].

O factor citotóxico associado aos grupos sanguíneos é denominado BabA (*blood group antigen binding adhesin*), esta proteína de membrana é uma adesina codificada pelo gene *babA* que se liga ao antígeno do grupo Lewis B nas células gástricas. Estirpes que expressam o gene *babA* aderem mais firmemente às células epiteliais gástricas, sendo evidente que este gene pode influenciar a severidade da doença [1, 11].

1.1.2 Enzimas da *H. pylori* que permitem a resistência ao ácido do estômago

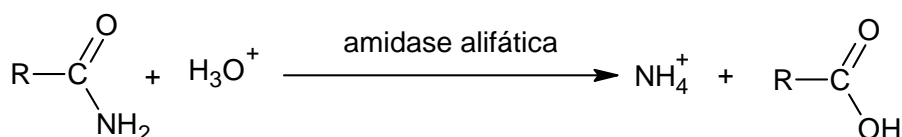
A *H. pylori*, como já foi referido, tem preferência pelas células gástricas da porção inferior do estômago, o antro, onde é produzido o suco gástrico altamente ácido ($\text{pH} \approx 2,0$). Para minimizar a acidez do estômago, a bactéria produz urease. A produção desta enzima pode, assim, explicar a capacidade da bactéria para sobreviver no ambiente considerado adverso. A enzima urease, é uma proteína de alto peso molecular, que promove a hidrólise da ureia levando à produção de amónia e dióxido de carbono segundo a reacção:



A resistência ao ácido tem sido considerada apenas baseada na produção de grandes quantidades de urease, mas estudos recentes mostraram que a resistência ao ácido é baseada em múltiplos factores interactivos e provavelmente em processos bem regulados, como a produção de genes que codificam as amidases (*amiE*) e as formamidases (*amiF*). A transcrição do gene *amiE*, que codifica a amidase alifática, é provavelmente um sistema alternativo de produção intracelular de amónia, o que aumenta fortemente a possibilidade da *H. pylori* permanecer a pH baixo [12].

As enzimas envolvidas na produção de amónia foram analisadas, e a sua actividade induzia significativamente a acidificação, tendo sido demonstrado que existem proteínas responsáveis pela regulação da actividade da urease, da amidase e da formamidase [13].

As amidases degradam amidas em amónia e no correspondente ácido carboxílico, segundo a reacção:



Foi demonstrado que a sequência de aminoácidos do gene *amiE* da amidase alifática da *H. pylori* é altamente homóloga à sequência da amidase alifática de cadeia curta da *Pseudomonas aeruginosa* [14]. Estes estudos mostram que a amidase da *H. pylori* é capaz de actuar em substratos específicos como a propionamida, a acetamida, a acrilamida e a formamida. Nos estudos referidos, a expressão do gene *amiE* resultou na produção de amidase com uma actividade catalítica de 138U para a propionamida, 72U para a acetamida e 67U para a acrilamida. Esta enzima não revelou actividade catalítica sobre a formamida nem sobre a ureia. Os resultados sugerem que os genes da *H. pylori* (*amiE* e *amiF*) codificam enzimas com especificidade para diferentes substratos e que nenhum deles actua sobre a ureia. A hidrólise da formamida é restrita à enzima formamidase codificada pelo gene *amiF* [14].

1.1.3 Prevalência da infecção

A infecção por *H. pylori* apresenta uma distribuição geográfica universal, estimando-se que metade da população mundial esteja infectada por esta bactéria [2].

De um modo geral, a prevalência da infecção é mais alta nos países subdesenvolvidas da África e da Ásia do que nos países mais desenvolvidos da Europa Ocidental e do Norte da América. O Japão e Portugal são uma excepção para esta tendência, onde a prevalência da infecção por *H. pylori* é superior a 80% (Figura 3).

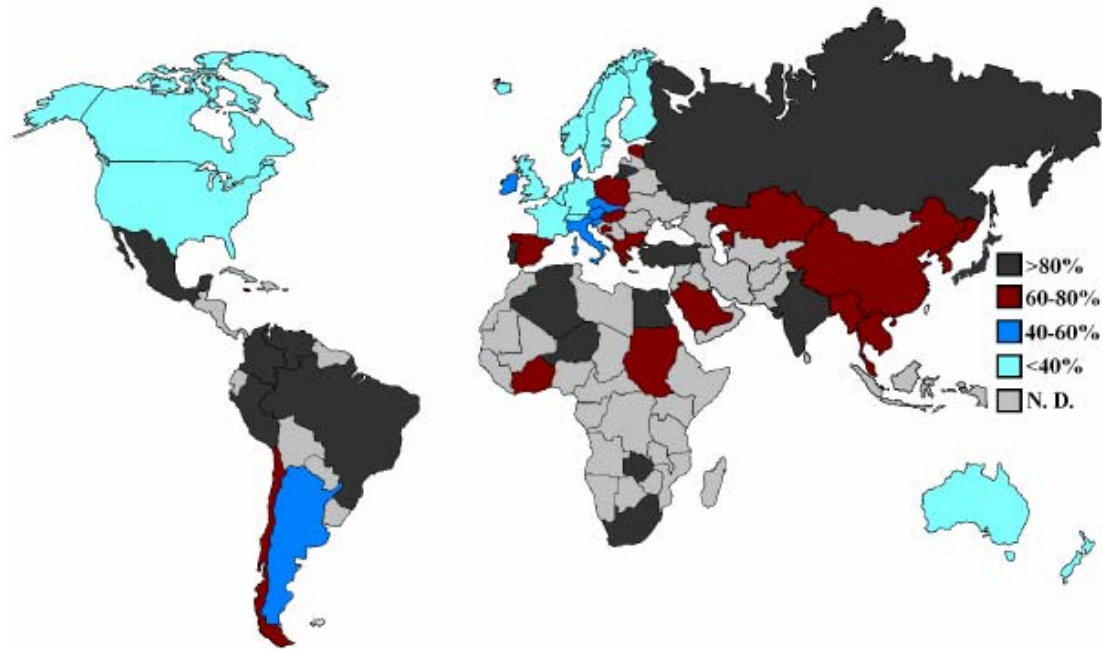


Figura 3 - Prevalência mundial da *H. pylori* (adaptado de [15]).

N.D. prevalência não determinada.

É possível distinguir dois perfis epidemiológicos, como mostra a Figura 4. Um dos perfis reporta-se aos países desenvolvidos ou industrializados, onde a prevalência é cerca de 10% nas crianças com idades compreendidas entre os 2 e os 8 anos, nos indivíduos com idades inferiores a 40 anos a prevalência é cerca de 20% e nos indivíduos com idades superiores a 60 anos chega a ser mais de 50%. O outro perfil epidemiológico é observado nos países em vias de desenvolvimento, nos quais a maioria da população jovem está infectada e a prevalência na população adulta varia entre os 70 e os 90% [3, 6, 16].

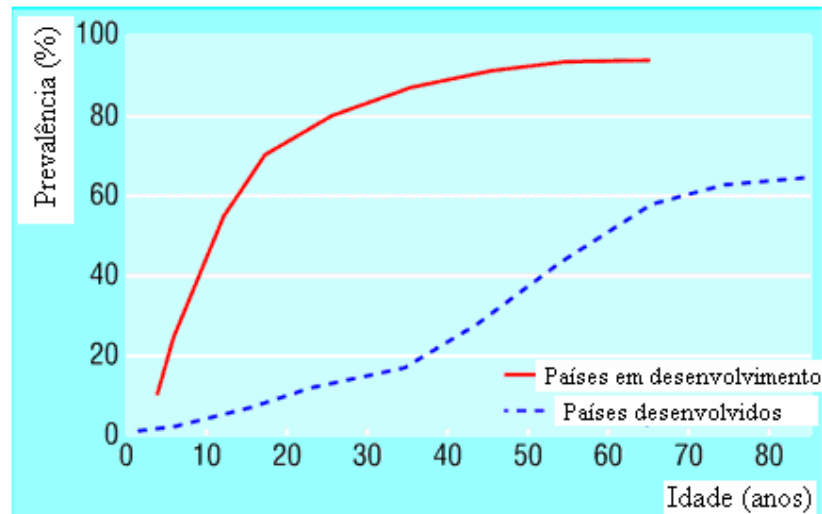


Figura 4 - Prevalência da infecção por *H. pylori* em relação à idade, nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento (adaptado de [16]).

A infecção ocorre, nos países em desenvolvimento, predominantemente durante a infância e uma vez adquirida a infecção persiste durante toda a vida, a menos que seja tratada correctamente. Nestes países, o índice de infecção permanece estável, mas nos países industrializados os valores têm vindo a diminuir substancialmente nas últimas décadas, provavelmente resultado da implementação de melhores condições higieno-sanitárias, especialmente durante a infância. No entanto, nota-se um aumento da prevalência em indivíduos com idades superiores a 40 anos, podendo ser explicada pelo risco de transmissão através do endoscópio (via de transmissão iatrogénica) [3].

Estudos epidemiológicos indicam que, em Portugal, a prevalência da infecção por *H. pylori* é uma das maiores entre os países da comunidade europeia. Estima-se que cerca de 50% das crianças portuguesas com 8 anos de idade já estão infectadas e que 90% dos portugueses com mais de 50 anos têm gastrite causada pela *H. pylori*. No entanto, apenas 10 a 20% desenvolvem doenças, como úlceras gástricas ou duodenais, carcinoma gástrico e linfoma de MALT [17].

Em Portugal, as taxas de incidência do cancro gástrico são das mais elevadas a nível mundial. A prevalência de infecção por *H. pylori* no adulto avaliada a partir de uma amostra de residentes no conselho de Vila Nova de Gaia foi de 80%. A prevalência da infecção por *H. pylori* em crianças com idades entre os 6 e 11 anos foi de 52,9%,

aumentando com a idade, a sobre ocupação da habitação e com as baixas condições sócio económicas. Foi encontrado em crianças com idades compreendidas entre 6 e 8 anos, uma forte associação com os factores relativos às condições de vida familiar [18].

1.1.4 Transmissão da infecção

As vias de transmissão da infecção por *H. pylori* ainda não estão completamente esclarecidas, admitindo-se que a transmissão pessoa-pessoa seja a via mais provável, estando implicada com a via oral-oral, a via gastro-oral, a via fecal-oral e com a alimentação materna [2, 19].

Foram realizados estudos epidemiológicos para identificar os factores que influenciam a transmissão da bactéria. Estes estudos indicam que o estado sócio económico é claramente o mais importante para o desenvolvimento da infecção. Em populações de baixo nível sócio económico, a transmissão da bactéria pode ser facilitada pelas precárias condições de higiene e pela sobre ocupação habitacional do agregado familiar. Com base em estudos epidemiológicos e microbiológicos foram definidas várias vias de transmissão como indica a Figura 5.

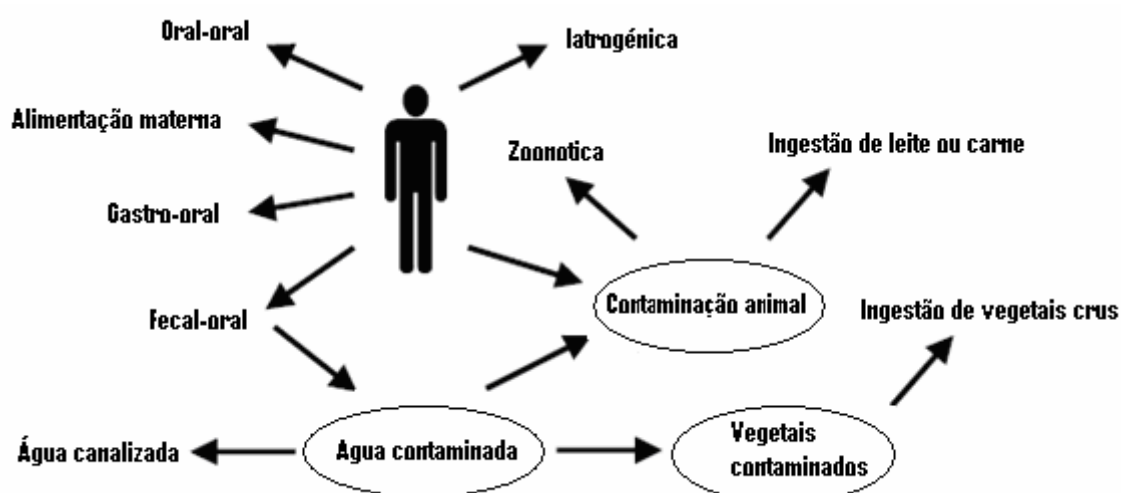


Figura 5 - Vias de transmissão da *H. pylori* (adaptado de [15]).

i. A transmissão por via oral-oral tem sido sugerida ao beijar ou, como acontece dentro de algumas etnias, onde as mães pré mastigam a comida para os seus bebés. A cavidade oral também tem sido proposta como reservatório da infecção e reinfeção pela *H. pylori*, pois a regurgitação do suco gástrico pode contaminar a boca, predispondo a colonização pela bactéria por tempo indeterminado [2].

ii. A alimentação materna é apontada como possível via de transmissão, embora estudos mais recentes indiquem que crianças nascidas de mulheres *H. pylori* positivas não têm maior probabilidade de adquirir a infecção. Admite-se que a contaminação através do leite materno só poderia ser possível se a bactéria sobrevivesse nos mamilos ou dedos [1].

iii. A transmissão gastro-oral foi indicada principalmente em crianças jovens que vomitam e onde o refluxo gastro-esofágico é frequente [1].

iv. A transmissão por via fecal-oral poderá ocorrer através da ingestão de alimentos ou de água contaminados. Existem evidências de que a *H. pylori* pode ser eliminada nas fezes. Não se conhece o mecanismo exacto de transmissão da bactéria por essa via, mas sabe-se que a disseminação das doenças infecciosas pela água se baseia na contaminação pelas fezes [2].

v. A transmissão iatrogénica é outra via possível de transmissão. A endoscopia é um procedimento médico comum, usado no diagnóstico de doenças gastrointestinais. Há referências de que os aparelhos endoscópicos possam funcionar como via de contaminação através de gotículas microscópicas de suco gástrico. Porque o endoscópio é uma estrutura complexa, existe dificuldade em desinfectá-lo correctamente, possibilitando a infecção entre doentes [1, 2].

vi. A água contaminada é considerada um factor de risco para a infecção por *H. pylori*. Estudos recentes verificaram a existência da bactéria na forma de biofilmes em filtros de água canalizada, o que contribui para a proliferação e transmissão da bactéria [15].

vii. A ingestão de legumes crus também tem sido apontada como via de transmissão da infecção. Os legumes crus são vulneráveis à colonização da bactéria quando contaminados com água usada para os lavar ou para a irrigação, especialmente em áreas onde existe grande incidência da infecção e onde a água não oferece qualidade [1].

viii. A via zoonótica é referenciada quando os indivíduos contactam directamente com animais, principalmente domésticos, ou quando ingerem leite cru contaminado. Embora o principal reservatório de *H. pylori* seja humano, a bactéria já foi isolada em primatas e gatos domésticos. No leite pasteurizado não há evidência da sobrevivência da bactéria [1].

1.1.5 Métodos de detecção da *H. pylori*

Existem vários métodos para detectar a presença da *H. pylori* no estômago. Os métodos têm sido tradicionalmente divididos em métodos invasivos e métodos não invasivos.

Os métodos invasivos são baseados em amostras gástricas usualmente obtidas por biópsia da mucosa gástrica na endoscopia. Estas amostras podem ser usadas para histologia, para culturas da bactéria, para testes rápidos da urease ou para a pesquisa de ADN, ARN ou produtos bacterianos.

Os métodos não invasivos usam produtos biológicos, como, o soro, a urina, a saliva, as fezes ou o ar exalado. Estas amostras podem ser usadas para testes serológicos

(pesquisa de anticorpos anti-*H. pylori*), para o teste respiratório da ureia, para a pesquisa de antígenos fecais ou para testes moleculares detectando o ADN ou ARN bacteriano [1, 3, 20].

A escolha do método apropriado para o diagnóstico da infecção depende de vários factores como a situação clínica do doente, a probabilidade de infecção, a sensibilidade e especificidade do método, o custo e disponibilidade do teste, a idade do doente e ainda o fim a que se destina o estudo. Por exemplo, os métodos não invasivos são mais indicados para estudos epidemiológicos [3, 21, 22].

A Tabela 1 sumaria o princípio de cada método, o tipo de amostra utilizado, o tempo dispendido para a execução do teste, as vantagens e as desvantagens dos vários métodos de detecção da infecção por *H. pylori*.

Tabela 1 - Métodos de detecção da *H. pylori*.

| Métodos invasivos | | | | Métodos não invasivos | | | | |
|---------------------|--|---|--|---|---|---|---|--|
| | Histologia | Cultura bacteriana | Pesquisa de ADN/ARN | Teste rápido da urease | Testes serológicos | Antígenos fecais | Extração de ADN/ARN | Teste respiratório da ureia |
| Princípio do método | Identificação histológica da <i>H. pylori</i> . | Crescimento da <i>H.pylori</i> em meios de cultura. | Pesquisa do ADN/ARN bacteriano. | Actividade da urease. | Pesquisa de anticorpos anti- <i>H. pylori</i> . | Pesquisa dos antígenos da <i>H.pylori</i> . | Deteção de ADN/ARN da <i>H.pylori</i> . | Actividade da urease. |
| Amostra | Biópsia | Biópsia | Biópsia | Biópsia | Soro, urina, saliva | Fezes | Fluidos biológicos | Ar exalado |
| Duração do teste | > 3h | ± 72 horas | > 6 h | < 1h | > 1h | > 2h | > 6h | < 1 h |
| Vantagens | Método de referência; fornece informações histológicas. | Permite a execução de antibiograma. | Grande especificidade (90-95%). | Simples de executar. | Pouco dispendioso. | Simples de executar; facilidade de obtenção da amostra. | Facilidade de obtenção da amostra. | Rápido e simples de executar. |
| Desvantagens | Exige processamento histológico; requer pessoal especializado. | Dispendioso; crescimento lento da bactéria. | Dispendioso; requer pessoal especializado. | Ocorrência de falsos-negativos com uso recente de antibióticos. | Não é útil para seguimento inicial da infecção. | Necessidade de pré-tratamento da amostra; ocorrência de falsos-positivos por interferência de outras bactérias. | Dispendioso requer pessoal especializado. | Dispendioso (¹³ C ureia é caro). |

Os métodos invasivos incluem:

- O exame histológico, que é considerado o método de referência para a detecção da *H. pylori*, a análise histopatológica é feita por observação microscópica directa da bactéria utilizando colorações histológicas apropriadas.
- A cultura bacteriana que é realizada a partir da biópsia da porção inferior do estômago, esta é inoculada em meios de cultura enriquecidos e apropriados ao crescimento da bactéria, a cultura é mantida em condições de microaerofilia.
- A pesquisa do ADN ou ARN bacteriano por extracção e amplificação do ADN ou ARN da bactéria localizada na porção de biópsia gástrica, aplicando métodos moleculares, como por exemplo a PCR.
- O teste rápido da urease, que se baseia na actividade da urease produzida pela *H. pylori* que converte a ureia em dióxido de carbono e amónia, a amónia produzida altera o pH do meio do teste, esta alteração pode ser observada macroscopicamente através da mudança de cor do meio.

Os métodos não invasivos incluem:

- Os testes serológicos, realizados normalmente recorrendo a técnicas de ELISA em que se pesquisa os anticorpos dirigidos contra os antígenos da bactéria, a pesquisa pode ser feita em fluidos biológicos como o soro, a urina, a saliva ou as fezes.
- A detecção de antígenos da bactéria que pode ser feita por imunocromatografia utilizando anticorpos monoclonais, este teste é aplicado a amostras de fezes.
- A extracção de ADN ou ARN genómico da bactéria, que pode ser feito em amostras de saliva, fezes e placa dentária através de métodos moleculares.

- O teste respiratório da ureia baseia-se na actividade da urease da *H. pylori*, para a realização deste teste é ingerida uma solução aquosa de ureia marcada com ^{13}C , a detecção do isótopo no dióxido de carbono do ar exalado indica que a ureia foi metabolizada e que a *H. pylori* está presente no estômago.

1.1.6 Tratamento e prevenção da infecção

Ainda não existe um tratamento para a infecção por *H. pylori* que seja totalmente eficaz. A resistência microbiana é uma das razões do insucesso do tratamento.

O tratamento convencional da infecção consiste na utilização de antimicrobianos como metronidazol, tetraciclina, claritromicina ou amoxicilina. Normalmente usa-se a combinação de três ou quatro antibióticos em terapias denominadas triplas ou quádruplas. Estas terapias variam muito na combinação dos antibióticos e na duração do tratamento, que pode variar entre 14 e 28 dias [3].

Mesmo após erradicação bem sucedida da bactéria, pode ocorrer a reinfeção, pois a resposta imunológica produzida durante a infecção, apesar de intensa, não protege contra as infecções subsequentes. Estudos clínicos e moleculares, porém, indicam que a recrudescência da infecção e a transmissão iatrogénica são responsáveis por grande parte dos casos de seroconversão após o tratamento, particularmente quando ocorre nos primeiros 12 meses de erradicação da bactéria [2].

Actualmente, os estudos sobre a *H. pylori* focam-se nas implicações da infecção, no mapeamento do genoma da *H. pylori* e na possibilidade de desenvolvimento de uma vacina, pois a vacina é considerada a mais promissora estratégia para a prevenção da infecção [23].

Os trabalhos pioneiros na década de 90 já evidenciaram a possibilidade de uma vacina contra a infecção por *H. pylori*. Sabe-se que o mecanismo da imunidade contra o microorganismo ocorre por via de activação de linfócitos T, que estimulam a produção de interleucinas e não por produção de anticorpos. Estima-se que, somente dentro de aproximadamente 10 a 15 anos, uma vacina segura e eficaz contra a *H. pylori* esteja disponível. Enquanto a vacina não está disponível, somente o melhor conhecimento da

epidemiologia da bactéria poderá contribuir para a elaboração de estratégias de prevenção da infecção [2].

1.2 Microextração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica que surgiu na década de 90, desenvolvida por Janusz Pawliszyn e seus colaboradores. É uma técnica de extração e concentração de analitos baseada na sorção (absorção e/ou adsorção) dependendo da fase estacionária da fibra. A extração pode ser feita por imersão da fibra na fase líquida ou por exposição à fase gasosa [24]. Após a exposição da fibra à amostra, os analitos são sorvidos, sendo depois desorvidos termicamente no injetor de GC. Esta metodologia permite a análise de compostos voláteis e semi-voláteis [25].

A primeira aplicação da SPME foi na avaliação de poluentes orgânicos em águas. Desde então, a SPME tem sido aplicada a um largo campo incluindo estudos de aromas, especialmente para a rápida amostragem da composição volátil de uma larga gama de produtos [26], análises ambientais, alimentares, forenses e clínicas [27], tem sido aplicada aos frutos, óleos vegetais, café, vinho, cortiça, cerveja, carne, leite e fluidos biológicos [26, 28]. Recentemente tem aumentado o interesse pela aplicação da SPME ao estudo dos compostos voláteis do ar exalado [29].

A metodologia de SPME começou a ser amplamente utilizada pelas suas múltiplas vantagens em relação a métodos tradicionais de extração, dado ser uma técnica simples, rápida, sensível, mais barata e que não requer solventes de extração [24, 25]. Uma outra vantagem é a existência de uma grande variedade de fases estacionárias para aplicação a diferentes classes de compostos [30, 31].

A aplicação desta técnica requer o prévio conhecimento da afinidade do revestimento da fibra para os compostos a estudar, bem como a optimização dos parâmetros experimentais de forma a incrementar a reprodutibilidade e a sensibilidade do método [32].

A quantidade de analitos sorvidos na fibra de SPME e a sensibilidade resultante são determinadas por sorção cinética e pelo coeficiente de distribuição do composto entre a superfície fase estacionária e a amostra [26].

Em SPME não ocorre uma extracção exaustiva, dado que o sistema tende para um equilíbrio em que os analitos se distribuem pelas diferentes fases do sistema.

A SPME como elimina o uso de extracção por solventes e permite que a extracção e os passos de concentração sejam executados simultaneamente, o tempo de análise encurta substancialmente [33].

Para a extracção dos compostos, a seringa de SPME (Figura 6) é colocada directamente em contacto com a matriz a analisar ou no espaço de cabeça da amostra. Esta metodologia pode ser aplicada à análise da composição volátil de amostras sólidas, líquidas ou gasosas [34, 35].



Figura 6 - Seringa de SPME (adaptado de: www.sigmaaldrich.com).

A seringa de SPME é o dispositivo mais usado para a exposição das fases estacionárias e consiste em dois componentes básicos, o suporte e a agulha. O suporte de SPME apresenta um êmbolo que permite guiar a fibra dentro e fora da agulha. A agulha serve para proteger a fibra e para perfurar os septos. A agulha inclui a fibra constituída por sílica fundida revestida com uma fina camada de filme polimérico e que constitui a fase estacionária (sólida, líquida ou mista). A Figura 7 mostra o suporte da seringa de SPME e o dispositivo da agulha com a microfibra.

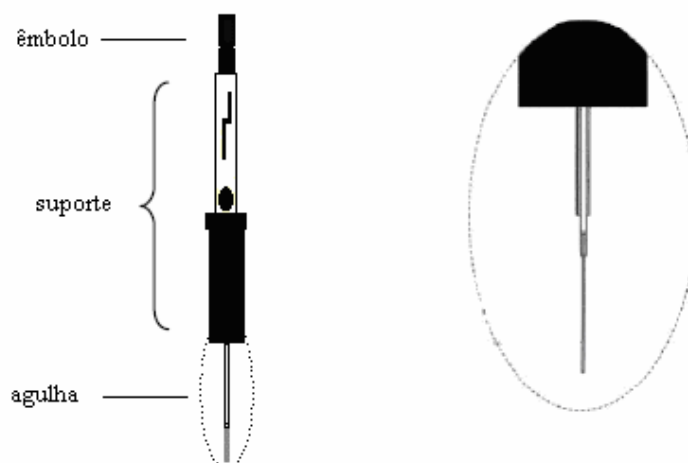


Figura 7 - Seringa de SPME e dispositivo da agulha com a fibra exposta (adaptado de [35]).

A fase estacionária pode apresentar diferentes composições e polaridades. Actualmente, existem diversas fases estacionárias comercialmente disponíveis. A escolha da fase estacionária mais adequada depende da composição volátil da amostra que se pretende analisar e das condições experimentais.

A Tabela 2 apresenta os diferentes tipos de revestimentos e as suas espessuras, que podem variar entre 7 e 100 μm , a temperatura máxima a que esta pode ser exposta no injector de GC, o modo de interacção com os compostos voláteis e as possíveis aplicações. A espessura do revestimento e a sua natureza (polar, apolar ou anfotérica) são as características que mais influenciam a selectividade e a eficiência de extracção [36].

Tabela 2 - Tipos de fibras comercialmente disponíveis pela Sigma Aldrich.

| Tipo de revestimento (espessura em μm) | Temperatura máxima do injector GC ($^{\circ}\text{C}$) | Modo de interacção | Aplicações sugeridas |
|---|--|-------------------------------|--|
| PDMS (30, 100) | 280 | Absorção | Compostos orgânicos apolares, |
| (7) | 340 | | hidrocarbonetos aromáticos policíclicos |
| PA (85) | 320 | Absorção | Compostos polares semi-voláteis |
| PDMS/DVB (60, 65) | 270 | Mista | Compostos voláteis, aminas, compostos nitroaromáticos |
| CW/DVB (65) | 260 | Mista | Compostos polares e álcoois |
| CAR/PDMS (75, 85) | 320 | Adsorção | Compostos de baixo peso molecular e gases |
| DVB/CAR/PDMS (30, 50) | 320 | Adsorção | Compostos voláteis e semi-voláteis |

PDMS: polidimetilsiloxano; PA: poliacrilato; DVB: divinilbenzeno; CW: carbowax; CAR: carboxen.

A interacção entre a fase estacionária e os compostos extraídos da amostra pode ser por absorção, por adsorção ou mista (Figura 8). A fase estacionária do tipo absorvente funciona como uma esponja, em que os analitos da amostra são retidos no seu interior. Na fase estacionária do tipo adsorvente os analitos são retidos à superfície. Esta pode apresentar micro (2-20 Å), meso (20-500 Å) e macro poros (> 500 Å). Neste tipo de revestimento existe um número mais limitado de locais de sorção do que nas do tipo absorventes, o que pode provocar competição entre os analitos. Para concentrações de analito muito elevadas nas fases estacionárias do tipo adsorventes ocorre fenómenos de saturação e consequentemente a competição entre os analitos. Para concentrações muito baixas de analito a resposta é linear. As fases estacionárias do tipo absorvente apresentam gamas de linearidade cerca de quatro vezes superiores às do tipo adsorvente [36, 37].

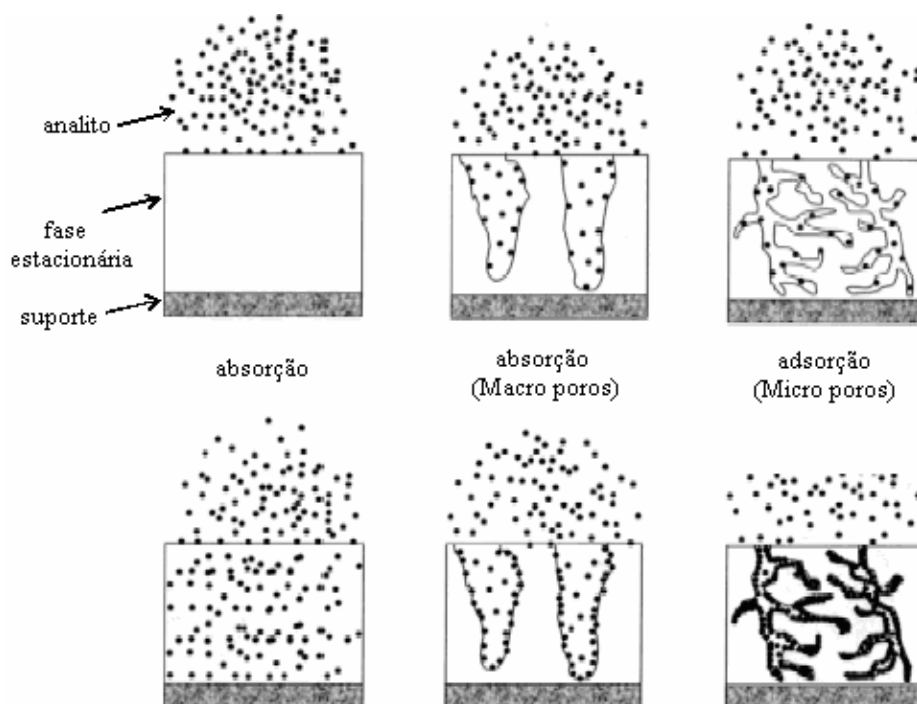


Figura 8 - Representação esquemática dos fenômenos de absorção e adsorção dos analitos pela fase estacionária (adaptado [37]).

As recomendações de uso das fibras comerciais, como as apresentadas na Tabela 2, são úteis do ponto de partida para a escolha do tipo de revestimento a usar, mas devem ser testadas experimentalmente, pois a selecção do revestimento é um procedimento crucial para o sucesso das análises. Deverá ser avaliada sempre, a eficiência extractiva da(s) fase(s) estacionária(s) relativamente aos analitos a estudar.

Assim, a aplicação da metodologia SPME requer a optimização de parâmetros que influenciam o processo de extracção e a resposta experimental expressa pela área cromatográfica, tais como o tipo de fase estacionária, o tempo e a temperatura de extracção e o volume de amostra [33]. Para a selecção da fibra deve-se ter em conta factores como a polaridade dos compostos a analisar, o seu peso molecular, a composição da amostra, a gama de concentração esperada e a temperatura de amostragem [26].

Para a elaboração deste trabalho foram escolhidas as fibras DVB/CAR/PDMS, CW/DVB e PA por serem indicadas para compostos voláteis polares, o que teoricamente se adequa aos ácidos em estudo, os ácidos propiónico e butírico.

1.2.1 Extracção em modo de espaço de cabeça

Como já foi referido, nas amostras líquidas a extracção dos compostos pode ocorrer por imersão da fibra de SPME na amostra ou por contacto desta com o espaço de cabeça [38, 39].

A Figura 9 esquematiza o processo de extracção e de dessorção em modo espaço de cabeça. A amostra é colocada num recipiente hermético. Depois, a agulha da seringa de SPME perfura o septo do recipiente de modo a expor a fibra em contacto com o espaço de cabeça da amostra. Esta é deixada em contacto com o espaço de cabeça, durante o tempo necessário para promover a transferência dos compostos da fase de vapor para a fase estacionária. Num sistema de duas fases, o equilíbrio estabelece-se entre a amostra e a fase estacionária da fibra e num sistema de três fases, o equilíbrio estabelece-se entre a amostra, o espaço de cabeça e a fase estacionária da fibra. Após a extracção, a agulha é recolhida no interior da seringa e esta é retirada do recipiente. Depois, a seringa é inserida no injector do GC, expondo a fibra durante o tempo necessário para a desorção térmica completa dos compostos extraídos. Por fim, a agulha é novamente recolhida e a seringa é retirada do injector, podendo a fibra ser novamente utilizada.

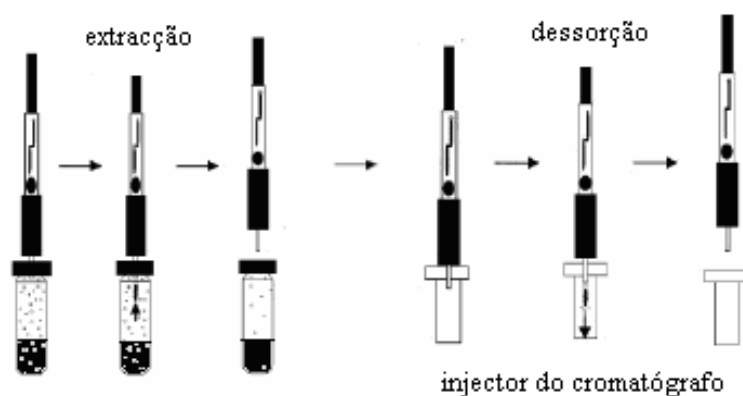


Figura 9 - Processo de extracção/dessorção dos analitos (adaptado de: www.sigmaaldrich.com).

1.2.2 Influência das condições experimentais

Os resultados obtidos pela metodologia de SPME podem ser influenciados pelas condições experimentais e pela natureza da matriz onde se encontram os analitos. A sensibilidade e reprodutibilidade do método dependem de parâmetros experimentais como a temperatura e o tempo de extracção, o volume de amostra e a concentração e o tipo e uniformidade da matriz [26].

A temperatura e o tempo de extracção devem ser controlados, pois são importantes para promover a transferência dos compostos voláteis para o espaço de cabeça da amostra, aumentando a volatilidade e a solubilidade. O tempo de extracção está dependente das características físico-químicas dos analitos em estudo, nomeadamente da sua volatilidade, sendo necessário usar um tempo de extracção superior para compostos de menor volatilidade [40].

O volume de amostra deve ser constante e o frasco onde se coloca a amostra deve ser o mesmo, pois a cinética de extracção é determinada pela capacidade do espaço de cabeça [41].

A composição da amostra influencia o equilíbrio de partição dos compostos entre as fases do sistema (fase estacionária e a fase de vapor).

A concentração dos analitos na amostra determina a quantidade de analito sorvido na fibra de SPME.

A alteração dos parâmetros experimentais pode afectar o coeficiente de distribuição e o índice de sorção e, consequentemente a quantidade de analitos sorvidos na fase estacionária, afectando assim, a reprodutibilidade e a sensibilidade do método [26].

1.2.3 Análise por GC-MS

Após a extracção dos analitos da amostra pela metodologia de SPME, eles podem ser identificados e quantificados por GC-MS. Estas duas técnicas permitem identificar componentes de misturas complexas devido ao poder de separação da cromatografia em fase gasosa e à capacidade de identificação por espectrometria de massa [42].

Um cromatógrafo de fase gasosa consiste num injector, numa fase móvel (gás), numa coluna de separação que contém uma fase estacionária e um detector (Figura 10). Depois da extracção da amostra, a fase estacionária da fibra de SPME sofre dessorção térmica no injector do cromatógrafo e, com o auxílio de um gás de arraste, normalmente o hélio, a amostra atravessa a coluna inserida no interior do forno, onde os componentes da mistura são separados por um programa de temperaturas, antes de chegarem ao detector. Na coluna os compostos são separados devido a diferenças de afinidade entre a fase móvel (gás) e a fase estacionária (coluna) e pelos seus pontos de ebulição. A separação dos componentes da mistura é determinada pela distribuição de cada componente entre estas duas fases. Um componente com pouca afinidade para a fase estacionária e com baixo ponto de ebulição elui rapidamente [42].

Após a saída dos compostos da coluna, são ionizados com electrões, sob vácuo, o que causa fragmentos reprodutíveis das moléculas (ionização de impacto electrónico). Depois de ocorrer a fragmentação, os iões criados podem ser detectados ou monitorizados por MS [42].

A injeção no GC pode dar-se em modo “split”, em que só parte da amostra é direccionada para a cabeça da coluna, ou em modo “splitless”, em que toda a amostra injectada é direccionada para a cabeça da coluna do cromatógrafo.

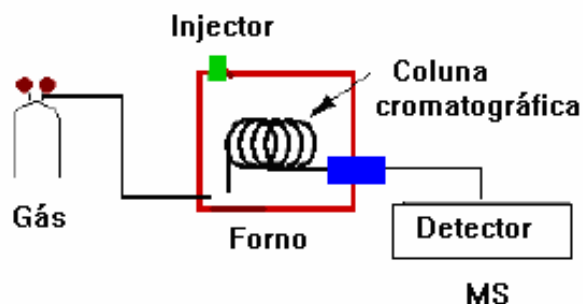


Figura 10 - Diagrama de GC-MS.

O MS é um instrumento que mede a razão massa carga (m/z) de iões em fase gasosa e permite medir a abundância de cada espécie iónica. Quando se usa a ionização em modo de impacto electrónico as cargas que se formam são M^+ (carga + 1). Todos os MS operam separando os iões na fase gasosa, esta separação ocorre pela interacção magnética ou campos eléctricos nas partículas carregadas [42].

Cada composto apresenta uma fragmentação característica, o espectro de massa, que, para um mesmo tipo de detector, só é dependente da energia dos electrões ionizantes e da temperatura a que ocorre a ionização. O espectro de massa obtido é traduzido num gráfico, onde no eixo do x é representado a razão m/z e no eixo dos y a abundância, traduzida em áreas cromatográficas (unidades arbitrárias) [42].

A partir destes gráficos, os cromatogramas, é possível retirar informação qualitativa, que está relacionada com o tempo de retenção e o espectro de massa característico de cada componente, e informação quantitativa, referente às áreas cromatográficas dos picos. Assim, a cada ponto do cromatograma está associado um espectro de massa. Neste é estabelecida a relação entre a razão m/z dos iões detectados e a intensidade relativa (abundância) de cada espécie iónica [42].

A detecção no MS pode ocorrer em dois modos distintos: Scan e SIM. No modo Scan o detector faz o varrimento de todas as unidades atómicas de massa ou razões m/z dentro do intervalo seleccionado, no modo SIM apenas alguns iões são monitorizados [42].

1.3 Objectivos do trabalho

Atendendo à elevada prevalência da infecção por *H. pylori* em todo o mundo e o facto de alguns dos meios de detecção da bactéria serem invasivos e ainda ao facto dos testes não invasivos disponíveis, actualmente, usarem reagentes com custo elevado, este trabalho terá como objectivo o desenvolvimento de uma metodologia por SPME/GC-MS para detectar a *H. pylori* recorrendo à utilização de amidas alifáticas de cadeia curta, a propionamida e a butiramida.

No presente trabalho serão optimizados alguns parâmetros experimentais da metodologia de SPME/GC-MS: o tipo de fase estacionária e o volume de amostra. Estes parâmetros permitirão incrementar a eficiência de extracção e a especificidade da metodologia proposta relativamente aos ácidos a pesquisar, o ácido propiónico e o ácido butírico. A metodologia desenvolvida será primeiro aplicada a uma amidase comercial e depois em culturas *in vivo in vitro* de *H. pylori* de um isolado clínico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

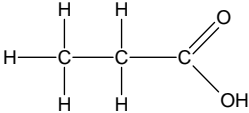
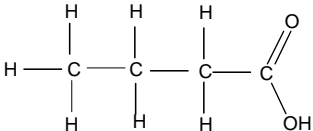
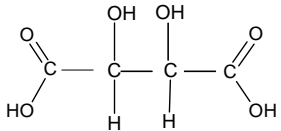
2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

Na realização deste trabalho, foram usados o ácido propiónico (Aldrich, 99,5%), o ácido butírico (Fluka, 99,5%) e o ácido tartárico (Panrec, 99,5%). As soluções padrão foram preparadas usando reagentes de grau de pureza p.a. e como solvente foi usada água destilada. Os reagentes sólidos foram pesados numa balança analítica de precisão 0,01 mg.

A Tabela 3 indica as propriedades físico-químicas dos ácidos usados.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos ácidos.

| Nome | Estrutura química | Massa molecular (u) | Solubilidade em água (g/mL) | pKa | Ponto de ebulição (°C) |
|----------------|---|---------------------|-----------------------------|------|------------------------|
| Ác. propiónico |  | 74 | 0,37 | 4,85 | 140,7 |
| Ác. butírico |  | 88 | 0,10 | 4,82 | 163,5 |
| Ác. tartárico |  | 150 | 1,39 | 2,98 | - |

Ainda foram usadas duas amidas alifáticas, a propionamida (Aldrich, 97%) e a butiramida (Fluka, 98%). Estas duas amidas, por acção de amidases originam os correspondentes ácidos carboxílicos, o ácido propiónico e o ácido butírico, que são ácidos voláteis passíveis de ser detectados por GC-MS.

2.1.2 Fibras de SPME

As fibras de SPME usadas neste trabalho foram adquiridas à Supelco (Aldrich, Bellefonte, PA, USA). Foram usadas três tipos de fibras, a DVB/CAR/PDMS de 100 µm de espessura, a CW/DVB de 65 µm de espessura e a PA de 85 µm de espessura.

As fibras foram condicionadas segundo as recomendações do fabricante, a fibra DVB/CAR/PDMS foi condicionada a 270°C durante 2 horas, a fibra CW/DVB foi condicionada 220°C durante 30 minutos e a fibra PA a 300°C durante 2 horas. Antes da primeira utilização diária, foi feito um branco da fibra para controlar possíveis efeitos de contaminação.

2.1.3 Amidase comercial

Utilizou-se uma enzima comercial, a *Amidase Pseudomonas aeruginosa recombinant*, do lote 065K3792, da Sigma. Segundo indicação do fabricante, uma unidade de enzima, determinada como hidroxamato transferase, converte, por minuto, a pH 7,2 e à temperatura de 37°C, 1,0 µmol de acetamida e hidroxilamina em aceto-hidroxamato e amónia. A quantidade de enzima utilizada foi de 0,011 mL que correspondia a 250 U. Para a sua diluição foi usado uma solução tampão de hidrogenofosfato de sódio (Merck, 98%) ajustada a pH 7,2 com hidróxido de sódio (Merck, 98%).

2.1.4 Culturas de *H. pylori*

Foram usadas culturas de *Helicobacter pylori* J99 de um isolado clínico em meio de cultura *Ham's F12* (HyClone, Logan). As culturas cresceram durante 3 dias, em condições de microaerofilia (5-6% de O₂ e 8-10% de CO₂) e à temperatura de 37°C. Estas culturas foram gentilmente cedidas pela Prof. Maria João Vieira, do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

2.2 Desenvolvimento da metodologia de SPME/GC-MS

Para o desenvolvimento da metodologia SPME/GC-MS foram inicialmente optimizados dois parâmetros experimentais: a selecção da fase estacionária e o volume de amostra. O estudo destes dois parâmetros foi realizado com o objectivo de aumentar a eficiência de extracção, que foi avaliada a partir das áreas cromatográficas obtidas.

Foram desenvolvidas duas metodologias de extracção, uma num sistema de duas fases, sendo consideradas neste sistema a fase de vapor e a fase estacionária, e outra, num sistema de três fases, tendo sido consideradas a fase de vapor, a fase estacionária e a fase líquida [43].

2.2.1 Selecção da fase estacionária

Para a selecção da fase estacionária, no sistema de duas fases, foram realizados ensaios de modo a comparar a eficiência extractiva e a reprodutibilidade de três tipos de fibras: a fibra PDMS/CAR/DVB, a fibra CW/DVB e a fibra PA.

Foram analisados 0,05 mL da solução de stock de cada ácido em simultâneo. Neste sistema foi assumido que a quantidade de 0,1 mL adicionada passa na totalidade para a fase de vapor às condições utilizadas.

As concentrações das soluções usadas foram de 0,496 g/L para o ácido propiónico e 0,479 g/L para o ácido butírico. O volume de 0,05 mL de cada ácido foi colocado num frasco de vidro de 120 mL de capacidade, foi selado hermeticamente com um septo de PTFE e cápsula de alumínio (Chromacol Ltd.) e colocado num banho termostatzado a uma temperatura de 37,0°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), durante 5 minutos. Depois, a fibra SPME foi inserida manualmente no espaço de cabeça do frasco, de forma a ficar exposta à fase de vapor da solução, permaneceu durante 5 minutos. Em seguida a fibra foi removida e inserida de imediato no injector de GC-MS. A detecção no MS foi realizada em modo Fullscan. Neste estudo foram efectuadas 3 réplicas para cada tipo de fibra.

2.2.2 Análise por GC-MS

A separação, a identificação e a quantificação dos ácidos foi feita com recurso à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), usando o equipamento Agilent Technologies, modelo 5973 Network Mass Selective Detector/6890N Network GC System. O injector tinha um *liner* de 0,75 mm de diâmetro interno. A análise decorreu em modo *splitless* (4,9 min.). Foi utilizada uma coluna capilar de polaridade intermédia de sílica fundida DB-FFAP (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) da J&W Scientific. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 125°C, sendo depois aquecido até à temperatura de 150°C à velocidade de 10°C/minuto, sendo de seguida aquecido até 220°C à velocidade de 50°C/minuto onde permaneceu a esta temperatura durante 1 minuto. O injector e a linha de transferência encontravam-se à temperatura de 250°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a um fluxo de 1,7 mL/minuto e a pressão à cabeça da coluna foi de 12 psi. O espectrómetro de massa trabalhou em modo de EI a 70 eV, a temperatura da fonte foi a 230°C e a temperatura do quadrupolo a 150°C. A Tabela 4 esquematiza as condições de análise usadas no GC-MS.

Tabela 4 - Condições de análise por GC-MS.

| Condições do GC | |
|---------------------------------------|---|
| coluna | DB-FFAP 30mx0,32mm; 0,25 μ m |
| forno | temperatura inicial 125°C 125°C até 220°C a 10°C/min. 220°C até 250°C a 50°C/min. 250°C durante 1 minuto |
| gás de arraste | hélio 1,7 mL/min. (fluxo contínuo) |
| injector | splitless (4,9 min.), liner 0,75 mm (d.i.), 250°C |
| Condições do MS | |
| intervalo m/z | modo Fullscan 30-300 m/z modo SIM 73, 74, 88 m/z |
| temperatura do liner de transferência | 250°C |
| temperatura do quadrupolo | 150°C |
| scans/s | 3 |
| impacto electrónico | 70 eV |

A análise no detector MS foi realizada em dois modos:

- O modo Fullscan, fazendo um varrimento 30-300 m/z , foi usado para os ensaios de selecção da fase estacionária, para a verificação da estabilidade das amidas à autoclavagem e para os ensaios com a amidase comercial.
- O modo SIM com a selecção dos iões m/z 73, 74 e 88, foi usado para estudar o volume de amostra, para a obtenção das curvas de calibração e para os ensaios com as culturas de *H. pylori*. Tendo sido inicialmente testadas as possibilidades de conjugação dos iões m/z 74, 88, 60; 74 e 88 e 73, 74 e 88. Este modo de detecção foi usado com o objectivo de incrementar a sensibilidade e especificidade da metodologia.

O procedimento para a obtenção dos espectros de massa dos dois ácidos está descrito no ponto 2.2.1 e 2.2.3.

2.2.3 Volume de amostra

Para a optimização do parâmetro relativo ao volume da amostra, foram analisados diferentes volumes da solução stock de cada ácido, para o ácido propiónico a concentração foi de 61,5 mg/L e para o ácido butírico foi de 59,8 mg/L. A partir destas soluções stock, foram retirados volumes de 0,05 mL; 2,5 mL; 12,5 mL e 25,0 mL de cada ácido. Estes volumes foram colocados em frascos de SPME, os quais foram selados hermeticamente com septo de PTFE e cápsula de alumínio. Depois foram termostatizados em banho a uma temperatura de 37,0°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) durante 5 minutos. Em seguida, foi inserida a fibra de SPME onde permaneceu 5 minutos. Por último, a fibra foi transferida para a porta do injector de GC-MS. A detecção no MS foi realizada em modo SIM, por selecção dos iões m/z 73, 74 e 88. Foram efectuadas três réplicas para cada ensaio.

2.3 Implementação da metodologia desenvolvida

A metodologia SPME/GC-MS foi aplicada para a obtenção de curvas de calibração no sistema de duas e três fases. A metodologia no sistema de três fases foi aplicada para a detecção dos ácidos produzidos por utilização de uma amidase comercial; para testar a estabilidade das amidas à autoclavagem e para os ensaios *in vivo in vitro* com culturas de *H. pylori*.

2.3.1 Curvas de calibração

A metodologia de SPME/GC-MS foi aplicada na obtenção de curvas de calibração, usando como detecção o modo SIM.

Foi elaborada uma curva de calibração para cada ácido, no sistema de duas fases, assim como a determinação dos limites de detecção e quantificação de cada ácido. Estas

curvas foram elaboradas para verificar a possível aplicação da metodologia à análise do ar exalado.

Foi elaborada uma curva de calibração para cada ácido no sistema de três fases, com o objectivo de quantificar os ácidos produzidos pelas culturas de *H. pylori*.

Para obter a curva de calibração num sistema de duas fases, foram analisados 0,05 mL de cada solução padrão, cujas massas de ácido propiónico variaram entre 3,1 µg e 24,8 µg, para o ácido butírico variaram entre 2,9 µg e 23,9 µg (Tabela 5). A metodologia de extracção e análise estão descritas respectivamente no ponto 2.2.1 e 2.2.3. Foram realizadas 3 réplicas de cada solução.

Tabela 5 - Massa dos ácidos usada para a elaboração das curvas de calibração no sistema de duas fases.

| Ácido propiónico (µg) | Ácido butírico (µg) |
|--------------------------|------------------------|
| 3,1 | 2,9 |
| 6,2 | 5,9 |
| 9,3 | 8,9 |
| 12,4 | 11,9 |
| 15,5 | 14,9 |
| 18,6 | 17,9 |
| 21,7 | 20,9 |
| 24,8 | 23,9 |

Para a curva de calibração num sistema de três fases, foram colocados em frascos de SPME, volumes de 2,5 mL; 5,0 mL; 12,5 mL e 25,0 mL de uma solução mãe contendo ácido propiónico (61,5 mg/L). A estes volumes foi adicionado água destilada até perfazer o volume de 25 mL. Em seguida foram adicionados 3,0 mL de ácido tartárico, obtendo um volume final de 28 mL. Os frascos foram selados hermeticamente com septo de PTFE e cápsula de alumínio. Depois foram termostatizados em banho a uma temperatura de 37,0°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) durante 5 minutos. O ácido tartárico foi adicionado para acidificar o meio e promover a libertação dos compostos voláteis para a fase de vapor. O mesmo procedimento foi executado para o ácido butírico, com concentração 59,8 mg/L.

Em seguida foi inserida a fibra de SPME onde permaneceu 5 minutos. Por último, a fibra foi inserida na porta do injector de GC-MS, tendo sido a detecção no MS em modo SIM, por selecção dos iões m/z 73, 74 e 88. A Tabela 6 apresenta a quantidade de massa dos ácidos para os diferentes volumes. Foram efectuadas 3 réplicas de cada solução.

Tabela 6 - Dados relativos às soluções para análise dos ácidos propiónico e butírico.

| solução mãe (mL) ^{a)} | ác. propiónico (µg) | ác. butírico (µg) | água (mL) | ác. tartárico (mL) ^{b)} |
|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------|---|
| 2,5 | 152,5 | 149,5 | 22,5 | 3,0 |
| 5,0 | 307,5 | 299,0 | 20,0 | 3,0 |
| 12,5 | 768,7 | 747,5 | 12,5 | 3,0 |
| 25,0 | 1537,5 | 1495,0 | - | 3,0 |

a) solução mãe de ácido propiónico (61,5 mg/L) e de ácido butírico (59,8 mg/L); b) concentração 50 g/L

2.3.2 Ensaio com a amidase comercial

A amidase comercial foi colocada em contacto com as duas amidas alifáticas, a propionamida e a butiramida, de forma a explorar se estas servem de substrato para a amidase e estudar a melhor condição da actividade enzimática em relação ao tempo de contacto com as amidas.

Foram efectuados dois ensaios para cada amida com variação no tempo de exposição das amidas com a enzima: 15 e 30 minutos. Para estes ensaios usou-se 0,011 mL de amidase (250 U) que foi dissolvida em 10 mL de uma solução tampão de hidrogenofosfato de sódio/hidróxido de sódio, de concentração 31,84 g/L, a pH 7,2.

No frasco de SPME de capacidade 120 mL, foram colocados 0,1 mL de amidase com 10 mL de propionamida de concentração 1,5 g/L, tendo sido esta mistura incubada num banho termostatzado a 37,0°C (\pm 0,1°C) durante 15 ou 30 minutos de acordo com o ensaio. Ao fim destes tempos, foram adicionados ao frasco 3 mL da solução de ácido tartárico (50 g/L), sendo em seguida inserida a fibra de SPME no frasco, onde permaneceu

durante 5 minutos. Depois, procedeu-se à análise no GC-MS em modo de detecção Fullscan, segundo as condições de análise descritas no ponto 2.2.3. Este ensaio compreendeu três réplicas, para cada um dos tempos. O mesmo procedimento aplicou-se à butiramida com concentração 1,75 g/L.

2.3.3 Ensaios com culturas de *H. pylori* obtidas a partir de um isolado clínico

2.3.3.1 Estabilidade das amidas à autoclavagem

Os ensaios *in vivo in vitro* com *H. pylori* envolveram o seu crescimento em meio de cultura líquido apropriado, o que implicou a esterilização de todo o material, bem como as soluções de propionamida e butiramida, que foram colocadas em contacto com as culturas bacterianas. Inicialmente, foi feito um ensaio para verificar se as amidas poderiam sofrer hidrólise pela pressão e temperatura da autoclavagem. Para este ensaio foram colocados em frascos de SPME 0,5 mL de cada solução de amida, a propionamida com concentração de 1,50 g/L e a butiramida com uma concentração de 1,75 g/L. Usou-se o volume de 0,5 mL de cada uma das amidas porque foi esta a quantidade usada para testar a produção dos ácidos pelas culturas de *H. pylori*. Este volume garantiu que as amidas estavam em excesso, permitindo a hidrólise por acção da amidase. Em seguida, os frascos foram selados e autoclavados a 121°C, a 1bar, durante 15 minutos. Após o arrefecimento dos frascos, procedeu-se à análise por SPME/GC-MS. Cada frasco foi termostatizado em banho a uma temperatura de 37,0°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) durante 5 minutos. Depois, a fibra de SPME foi inserida no frasco, onde permaneceu 5 minutos. Por último, a fibra foi transferida para a porta do injector de GC-MS, tendo sido a detecção no MS em modo de detecção Fullscan. Foram efectuadas 3 réplicas neste ensaio.

2.3.3.2 Detecção dos ácidos produzidos pela *H. pylori*

Nos ensaios *in vivo in vitro* com culturas de *H. pylori* foram estudados alguns parâmetros de modo a verificar a produção dos ácidos carboxílicos pela bactéria. Foram realizados ensaios variando a concentração das amidas e o tempo de exposição destas com as culturas bacterianas. Nestes ensaios a bactéria cresceu no meio de cultura líquido (25 mL) em frascos de SPME de capacidade 120 mL.

Foram realizados 4 ensaios com culturas de *H. pylori*. Foram efectuadas 3 réplicas para cada ensaio. A Tabela 7 resume as condições usadas nos ensaios *in vivo in vitro* com as culturas de *H. pylori*.

Tabela 7 - Ensaios com culturas de *H. pylori*.

| Ensaio | Concentração bacteriana (nº bactérias/mL) | Concentração da propionamida (g/L) | Concentração da butiramida (g/L) | Volume de cada amida (mL) | Tempo de exposição (minutos) |
|--------|--|--|--|---------------------------------|------------------------------------|
| A1 | $\approx 10^8$ | 1,5 | 1,75 | 0,5 | 1440 |
| A2 | $< 10^8$ | 1,5 | 1,75 | 0,5 | 1440 |
| B | $\approx 10^8$ | 1,5 | 1,75 | 0,5 | 60 |
| C | $\approx 10^8$ | 15,0 | 17,5 | 0,5 | 30 |

No primeiro ensaio (A1) foram adicionados em simultâneo ao meio de cultura com a bactéria 0,5 mL de uma solução aquosa de propionamida de concentração 1,5 g/L e 0,5 mL de uma solução de butiramida de concentração 1,75 g/L. Após 1440 minutos (24 horas) de incubação do meio de cultura, os frascos foram termostatizados a 37,0°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), durante 5 minutos. Ao fim deste tempo, o meio foi acidificado com 3,0 mL de ácido tartárico com uma concentração de 50 g/L, seguidamente a fibra CW/DVB foi inserida manualmente no espaço de cabeça do frasco durante 5 minutos, depois injectada no GC-MS, em modo de detecção SIM, segundo as condições descritas no ponto 2.2.3.

O mesmo ensaio foi repetido (**A2**) com mais três réplicas de novas culturas. Neste ensaio, o número de bactérias presentes nas culturas era inferior a 10^8 células/mL usado no primeiro ensaio.

Outro ensaio (**B**) foi realizado com a adição da mesma quantidade de amidas ao meio de cultura com a bactéria, mas com diminuição do tempo de exposição destas com as amidas para 60 minutos. O procedimento de análise foi igual ao descrito no ensaio A1.

No último ensaio (**C**) as amidas foram adicionadas ao meio de cultura com a bactéria, numa concentração dez vezes superior à dos ensaios anteriores, concentração 15,0 g/L para a propionamida e 17,5 g/L para a butiramida e diminuindo o tempo de exposição com as amidas para 30 minutos. O procedimento de análise foi igual ao descrito nos ensaios anteriores.

Para ter a certeza de que os ácidos detectados eram resultado da hidrólise das amidas adicionadas pela acção da amidase bacteriana, foram feitos 3 ensaios em branco:

- i) análise apenas ao meio de cultura líquido (25 mL);
- ii) análise do meio de cultura com a adição de 0,5 mL de cada solução de amida (propionamida e butiramida);
- iii) análise do meio de cultura líquido com a bactéria.

Todos os ensaios em branco foram feitos nas mesmas condições experimentais dos ensaios A1, A2, B e C.

2.4 Tratamento de dados

A identificação dos ácidos propiónico e butírico foi determinada por comparação com os tempos de retenção e os espectros de massa dos padrões puros dos dois ácidos.

A abordagem quantitativa foi realizada com base na integração das áreas dos picos correspondentes aos ácidos, com base nas curvas de calibração externas estimou-se a concentração de cada ácido. Todos os ensaios foram efectuados, pelo menos, com 3 réplicas e a reprodutibilidade foi expressa pelos CVs nas tabelas e pelas barras de erro nos gráficos.

O tratamento estatístico usado para a comparação das áreas cromatográficas foi feito pela aplicação do teste de t de Student emparelhado a uma distribuição normal com 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$), com o objectivo de avaliar se existiam ou não diferenças estatisticamente significativas entre as áreas obtidas, com recurso à ferramenta Microsoft Office Excel 2003.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento da metodologia de SPME/GC-MS

3.1.1 Critérios para a selecção das amidas

Um dos critérios que levou à selecção do tipo de amidas alifáticas a usar neste estudo, prendeu-se com a necessidade de se obterem ácidos voláteis ou semi-voláteis que pudessem ser identificados e quantificados por GC-MS. Outro critério, foi o conhecimento dos substratos em que a amidase bacteriana é activa, sabendo-se que a *H. pylori* possui a enzima amidase e que ela actua eficazmente sobre a propionamida, a acetamida e a acrilamida [14]. Sendo a acetamida e a acrilamida tóxicas, não foram seleccionadas, uma vez que, um último critério, era a necessidade de se usar amidas que não apresentassem toxicidade, para que pudessem ser administradas oralmente. Assim, foram seleccionadas a propionamida e a butiramida, que possui uma cadeia carbonada com mais um carbono do que a propionamida. Estas amidas, por acção de amidases, originam os ácidos voláteis correspondentes, o ácido propiónico e o ácido butírico.

A propionamida e a butiramida caracterizam-se por serem amidas alifáticas de cadeia curta que podem vir a ser administradas por via oral, uma vez que não foi encontrada literatura que indicasse a sua toxicidade.

3.1.2 Selecção da fase estacionária

Para a optimização da metodologia SPME/GC-MS em relação à selecção da fase estacionária, no sistema de duas fases, em modo de detecção Fullscan, foram testados três tipos de fibras, a DVB/CAR/PDMS, a CW/DVB e a PA, sendo as áreas cromatográficas obtidas comparadas entre si.

A Tabela 8 indica a média das áreas cromatográficas obtidas por análise dos ácidos em função da fase estacionária usada. Para o ácido propiónico, a fibra de CW/DVB apresentou áreas cromatográficas na ordem dos 48×10^6 , a fibra de DVB/CAR/PDMS dos $24,8 \times 10^6$ e a fibra de PA na ordem dos $0,7 \times 10^6$.

Para o ácido butírico, a fibra de CW/DVB apresentou áreas cromatográficas na ordem dos $161,8 \times 10^6$, a fibra de DVB/CAR/PDMS dos $133,6 \times 10^6$ e a fibra de PA dos $3,9 \times 10^6$.

Tabela 8 - Média das áreas cromatográficas obtidas para os dois ácidos utilizando diferentes fases estacionárias.

| Fase estacionária | ácido propiónico | | ácido butírico | |
|-------------------|--|--------|--|--------|
| | Áreas ^{a)} (u.a. ^{b)} , 10^6 | CV (%) | Áreas ^{a)} (u.a. ^{b)} , 10^6 | CV (%) |
| CW/DVB | 48,0 | 5,1 | 161,8 | 3,0 |
| DVB/CAR/PDMS | 24,8 | 5,5 | 133,6 | 5,3 |
| PA | 0,7 | 6,4 | 3,9 | 6,1 |

a) média n=3; b) u.a. unidades arbitrárias.

Na Figura 11 estão representadas as áreas cromatográficas totais obtidas para os ácidos propiónico e butírico com os três tipos de fase estacionária.

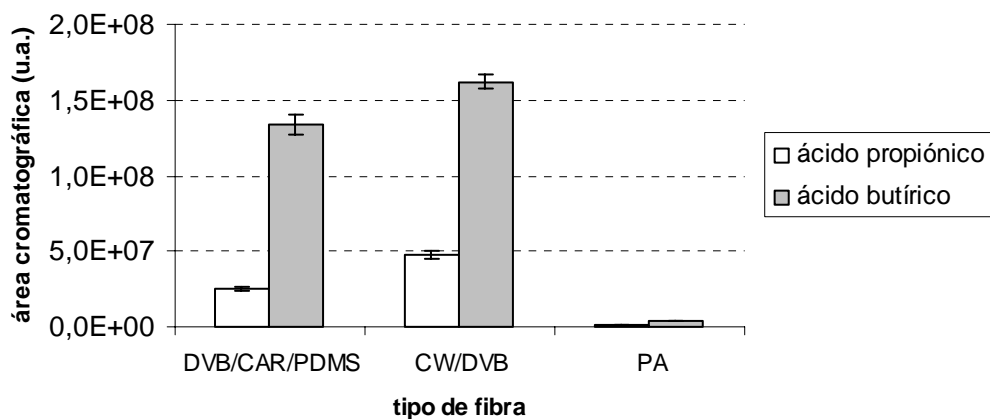


Figura 11 - Área cromatográfica dos ácidos em função da fase estacionária usada.

u.a. unidades arbitrárias.

O valor analítico obtido, área cromatográfica, no sistema de duas fases, depende fundamentalmente da volatilidade dos ácidos e da afinidade destes à fase estacionária. Este último parâmetro favorece neste ensaio a resposta do ácido butírico, tendo sido obtido para este ácido áreas cromatográficas 3 a 4 vezes maiores do que o ácido propiónico, para todas as fibras testadas.

Para a fibra de PA as áreas cromatográficas obtidas, para ambos os ácidos, são muito menores, sendo a ordem de grandeza das áreas cerca de 200 vezes menos em relação às áreas das outras duas fibras. Pode-se concluir que esta fibra apresenta pouca afinidade para os ácidos em estudo.

A fibra de CW/DVB apresenta áreas cromatográficas, para ambos os ácidos, superiores às da fibra de DVB/CAR/PDMS. Para o ácido propiónico as áreas da fibra de CW/DVB são sensivelmente o dobro da fibra de DVB/CAR/PDMS. Para o ácido butírico embora as áreas de CW/DVB sejam superiores são da mesma ordem de grandeza da fibra de DVB/CAR/PDMS.

Em termos de reprodutibilidade, expressa em CV, todas as fases estacionárias apresentam um comportamento similar com CV (%) que variou entre 3,0 e 6,4.

Tendo em conta os resultados obtidos, estabeleceu-se que o revestimento de CW/DVB seria o mais indicado para o estudo, dado que este revestimento apresenta áreas cromatográficas superiores aos outros revestimentos, apresentando uma maior eficiência na extracção dos ácidos.

A fibra de CW/DVB é indicada para análise de álcoois e compostos polares (Mw 40-275). Esta fibra contém macro, meso e microporos e por ser uma fibra mista, apresenta as propriedades de absorção do polímero líquido (Carbowax) com as propriedades de adsorção das partículas polares (Divinilbenzeno) [43]. Assim, o seu efeito sinérgico de adsorção e absorção da fase estacionária promove uma maior capacidade de retenção e, consequentemente, uma maior sensibilidade do que as fibras de absorção [24].

3.1.3 Análise por GC-MS

Foi feita a análise por GC-MS em modo Fullscan para obter os espectros de massa dos dois ácidos. As Figuras 12 e 13 representam os espectros de massa obtidos respectivamente para o ácido propiónico e para o ácido butírico.

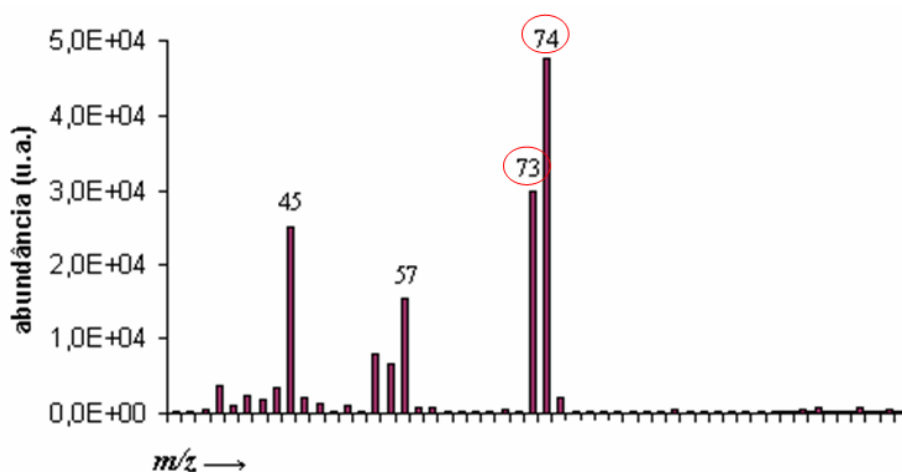


Figura 12 - Espectro de massa do ácido propiónico de concentração 0,496 g/L.

u.a. unidades arbitrárias.

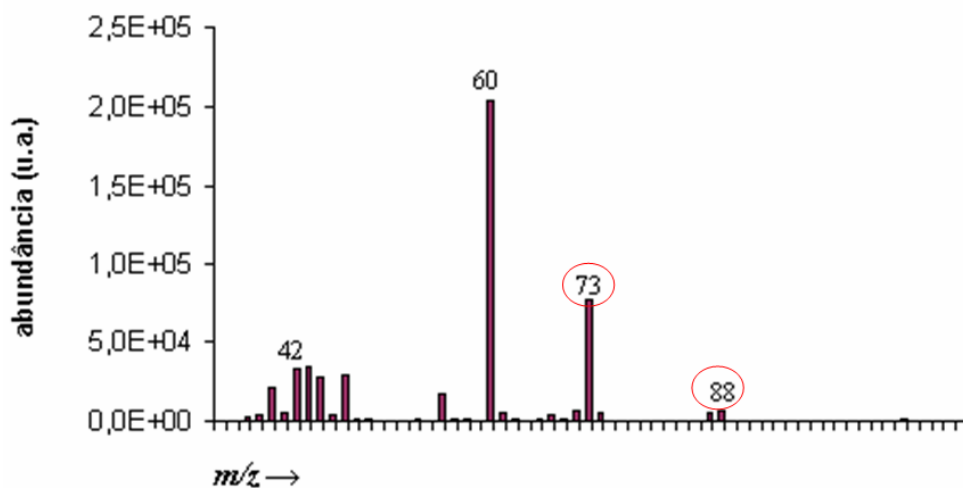


Figura 13 - Espectro de massa do ácido butírico de concentração 0,479 g/L.

u.a. unidades arbitrárias.

Após a obtenção dos espectros de massa dos dois ácidos em modo Fullscan foi testada a possível conjugação de iões para serem seleccionados para a análise por GC-MS em modo SIM. Foram testadas várias possibilidades, a selecção dos iões m/z 73, 74, 88 foi a que apresentou melhores resultados em termos de resolução cromatográfica e intensidades relativa do sinal.

A Figura 14 mostra o cromatograma dos dois ácidos obtido a partir da selecção dos iões m/z 73, 74 e 88.

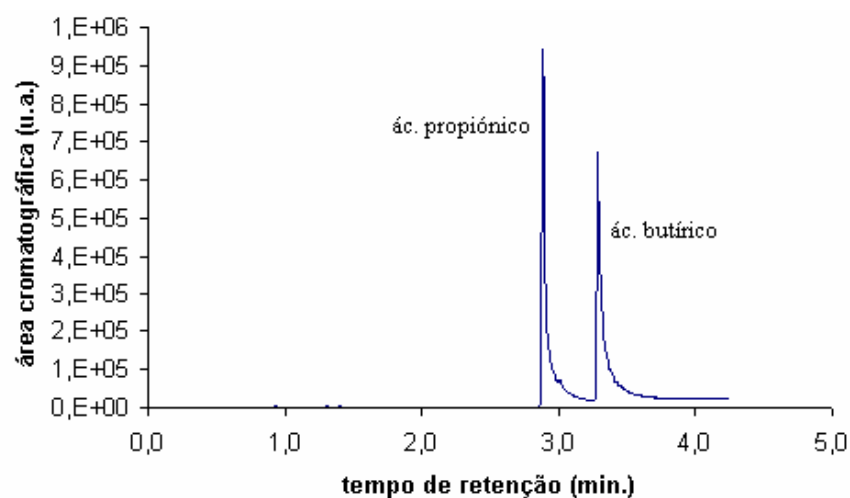


Figura 14 - Cromatograma dos ácidos propiónico e butírico obtido por selecção dos iões m/z 73, 74 e 88.

u.a. unidades arbitrárias.

3.1.4 Volume de amostra

Para otimizar a metodologia de SPME/GC-MS em relação ao volume de amostra foram estudados vários volumes (0,05 mL; 2,5 mL; 12,5 mL e 25,0 mL) dos dois ácidos em separado. Para o ácido propiónico a concentração foi de 61,5 mg/L e para o ácido butírico de 59,8 mg/L. Estes ensaios foram determinados em modo de detecção SIM.

A Tabela 9 indica a relação entre as áreas cromatográficas obtidas e os volumes de amostra estudados usando como fase estacionária a fibra de CW/DVB.

Tabela 9 - Áreas cromatográficas dos ácidos e os volumes de solução analisados.

| ácido propiónico | | | ácido butírico | | |
|------------------|--|--------|----------------|--|--------|
| Volume (mL) | Área ^{a)} (u.a. ^{b)} , 10 ⁶) | CV (%) | Volume (mL) | Área ^{a)} (u.a. ^{b)} , 10 ⁶) | CV (%) |
| 0,05 | 0,8 | 8,4 | 0,05 | 0,7 | 8,2 |
| 2,50 | 5,4 | 5,6 | 2,50 | 3,6 | 7,2 |
| 12,50 | 5,9 | 3,0 | 12,50 | 4,0 | 4,6 |
| 25,00 | 4,7 | 8,5 | 25,00 | 3,3 | 8,5 |

a) média n=3; b) u.a. unidades arbitrárias.

A Figura 15 indica a diferença relativa das áreas cromatográficas obtidas para cada ácido em relação ao volume total de amostra presente no frasco de SPME.

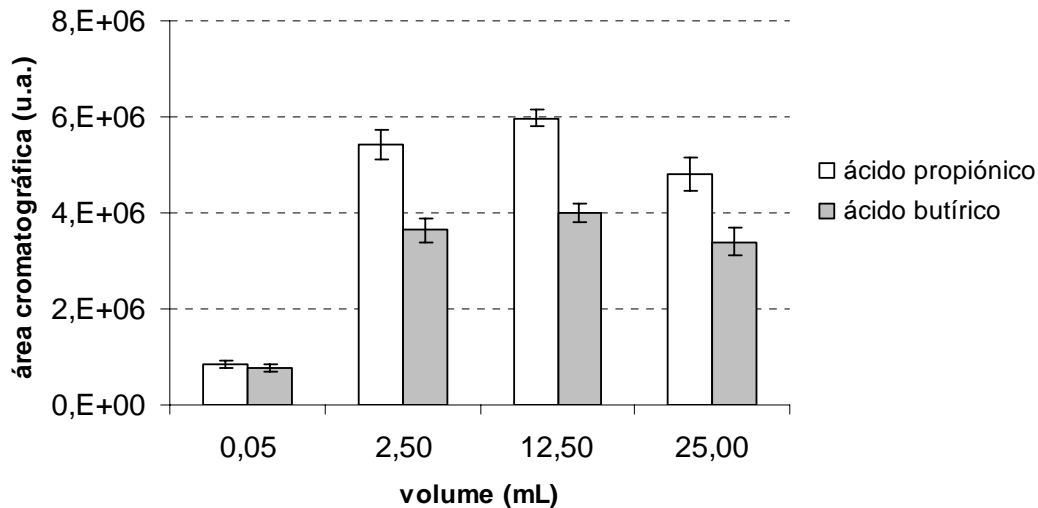


Figura 15 - Áreas cromatográficas para os diferentes volumes dos dois ácidos.
u.a. unidades arbitrárias.

Pelos dados obtidos, podemos observar que as áreas cromatográficas, quando se utilizaram volumes de 2,5 mL, 12,5 mL e 25,0 mL foram da mesma ordem de grandeza, não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$), quer quando se utilizou o ácido propiónico, quer quando se utilizou o ácido butírico. As áreas cromatográficas do ácido propiónico são maiores do que as áreas cromatográficas do ácido butírico. Sendo o ácido propiónico mais volátil que o ácido butírico, como mostra a Tabela 3, existe o efeito da volatilidade que poderá justificar as diferenças encontradas.

A partir do volume de 2,5 mL, não há aumento significativo das áreas cromatográficas com o aumento do volume de amostra, possivelmente porque a fibra se encontra saturada, pois ambos os ácidos apresentam o mesmo comportamento.

Quando se utilizou 0,05 mL de volume de amostra, as áreas cromatográficas foram inferiores às obtidas para todos os outros volumes, pois a quantidade de ácidos presente na fase de vapor é inferior. Com este volume ainda se obtém uma boa resposta da fibra.

A área do ácido butírico, quando a determinação é feita em modo de detecção Fullscan, é cerca de 3 vezes superior à do ácido propiónico (Figura 11), quando a detecção é feita em modo SIM, esta diferença não se verifica, devido à selecção dos iões (m/z 73, 74 e 88).

3.2 Implementação da metodologia desenvolvida

3.2.1 Curvas de calibração

A curva de calibração obtida no sistema de duas fases (fase estacionária e fase de vapor), em modo de detecção SIM, apresenta uma equação de regressão linear para o ácido propiónico $y=1385992x-2E+06$ e para o ácido butírico $y=1491480x-2E+06$. As Figuras 16 e 17 representam as curvas de calibração obtidas no sistema de duas fases respectivamente para o ácido propiónico e ácido butírico. A Tabela 10 sumaria os dados obtidos a partir das duas curvas de calibração para os dois ácidos num sistema de duas fases.

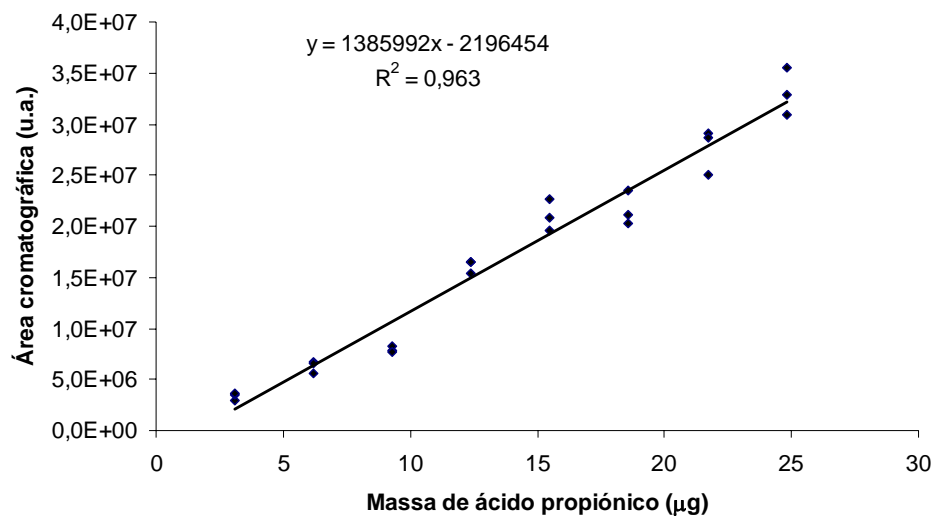


Figura 16 - Curva de calibração do ácido propiónico no sistema de SPME de duas fases.
u.a. - unidades arbitrárias.

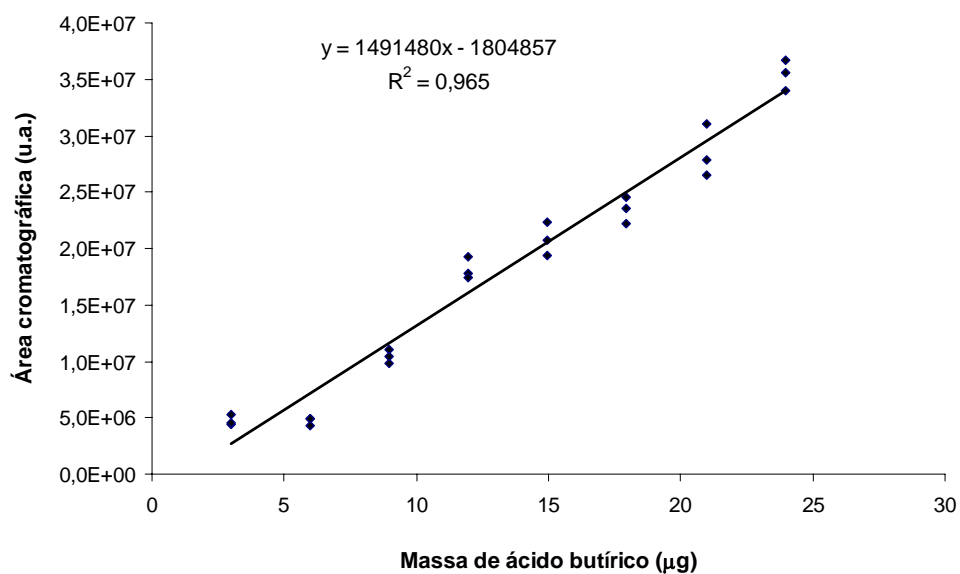


Figura 17 - Curva de calibração do ácido butírico no sistema de SPME de duas fases.
u.a. - unidades arbitrárias.

Tabela 10 - Dados obtidos a partir das curvas de calibração para o sistema de duas fases.

| | ácido propiónico | ácido butírico |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Equação da curva | $y=1385992x-2E+06$ | $y=1491480x-2E+06$ |
| R^2 | 0,963 | 0,965 |
| Gama de linearidade | 3,1-24,8 μg | 2,9-23,9 μg |
| Limite de detecção | 1,5 μg | 1,5 μg |
| Limite de quantificação | 3,1 μg | 2,9 μg |

No sistema de duas fases, o limite de detecção foi de 1,5 μg para os dois ácidos, tendo sido considerado o limite de detecção a menor área cromatográfica obtida, e cujo pico cromatográfico era três vezes superior ao ruído. O limite de quantificação foi de 3,1 μg e 2,9 μg respectivamente para os ácidos propiónico e butírico, tendo sido considerado o limite de quantificação a menor área cromatográfica obtida, e cujo pico cromatográfico foi dez vezes superior ao ruído.

A curva de calibração obtida no sistema de três fases (fase estacionária, fase de vapor e fase líquida), em modo de detecção SIM, apresenta uma equação de regressão linear para o ácido propiónico $y=2541x-2E+05$ e para o ácido butírico $y=2395x-1E+05$. As Figuras 18 e 19 representam as curvas de calibração obtidas no sistema de três fases, respectivamente para o ácido propiónico e para o ácido butírico. A Tabela 11 sumaria os dados obtidos a partir das curvas de calibração para os dois ácidos num sistema de três fases.

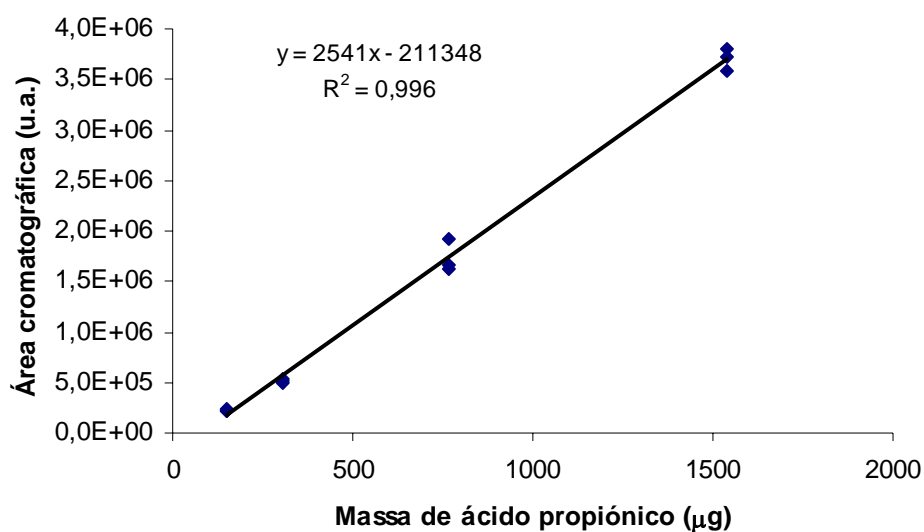


Figura 18 - Curva de calibração do ácido propiónico no sistema de SPME de três fases.
u.a.=unidades arbitrárias.

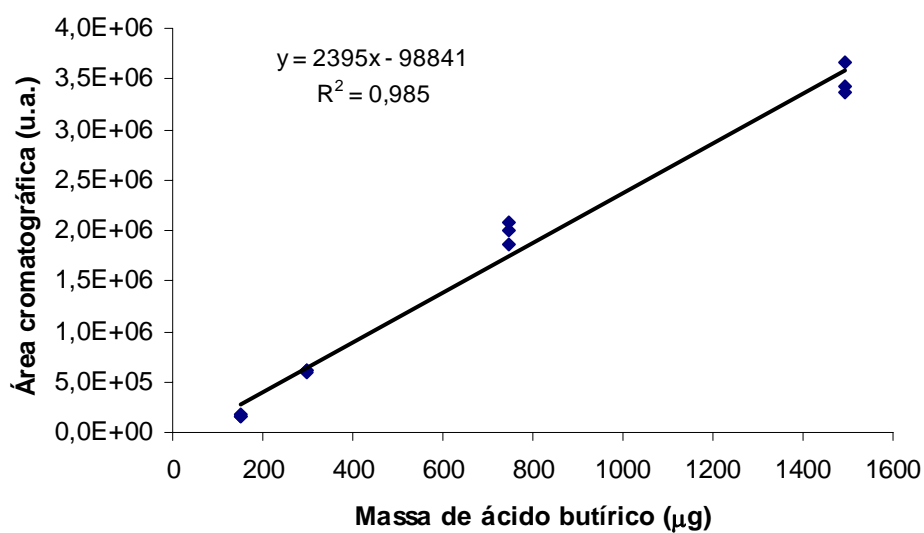


Figura 19 - Curva de calibração do ácido butírico no sistema de SPME de três fases.
u.a.=unidades arbitrárias.

Tabela 11 - Dados obtidos a partir das curvas de calibração para o sistema de três fases.

| | ácido propiônico | ácido butírico |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Equação da curva | $y=2541x-2E+05$ | $y=2395x-1E+05$ |
| R^2 | 0,996 | 0,985 |
| Gama de linearidade | 152,5 – 1537,5 µg | 149,5 – 1495,0 µg |
| Limite de detecção | - | - |
| Limite de quantificação | 152,5 µg | 149,5µg |

No sistema de três fases, não foi determinado o limite de detecção. O limite de quantificação foi de 152,5 µg e de 149,5 µg para o ácido propiônico e butírico respectivamente, o que significa a presença de 152,5 µg de ácido propiônico e de 149,5 µg de ácido butírico em 28 mL de líquido.

Considerando o limite de detecção para os dois ácidos neste sistema, um valor muito próximo do valor do limite de quantificação (152,5 µg para o ácido propiônico e 149,5 µg para o ácido butírico), podemos afirmar que quando se usa o sistema de duas fases se obtêm limites de detecção e de quantificação inferiores aos obtidos com o sistema de três fases, tornando o sistema de duas fases mais sensível para a detecção dos ácidos em estudo do que o sistema de três fases.

As quantidades de ácidos propiônico e butírico produzidas pelas culturas de *H. pylori* foram calculadas com base nestas duas curvas de calibração (sistema de três fases), recorrendo às respectivas equações de regressão de linearidade.

3.2.2 Ensaios com amidase comercial

Para verificar a produção dos ácidos carboxílicos pela hidrólise das amidas alifáticas colocadas em contacto com a amidase comercial, foram feitos dois ensaios por aplicação da metodologia SPME/GC-MS em modo de detecção Fullscan. Este ensaio teve como objectivo fazer um teste exploratório para demonstrar que as amidas alifáticas de cadeia curta servem de substrato para a amidase e estudar a melhor condição da actividade enzimática em relação ao tempo de contacto com as amidas.

Um dos ensaios foi feito com 15 minutos de contacto das amidas com a amidase e outro com 30 minutos. Em ambos os tempos foram detectados os ácidos propiónico e butírico.

A Figura 20 mostra um dos cromatogramas obtidos por hidrólise da propionamida, onde se pode observar o ácido propiónico e a propionamida. A Figura 21 mostra um cromatograma obtido por hidrólise da butiramida onde se pode observar o ácido butírico e a butiramida.

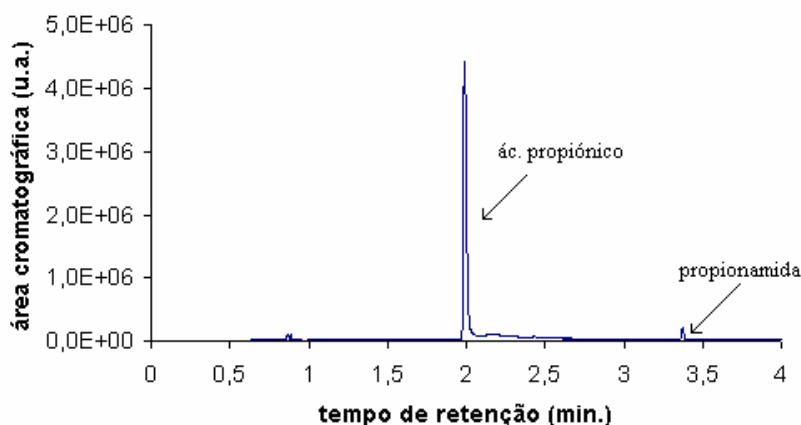


Figura 20 - Cromatograma do ácido propiónico obtido por hidrólise da propionamida.
u.a. unidades arbitrárias.

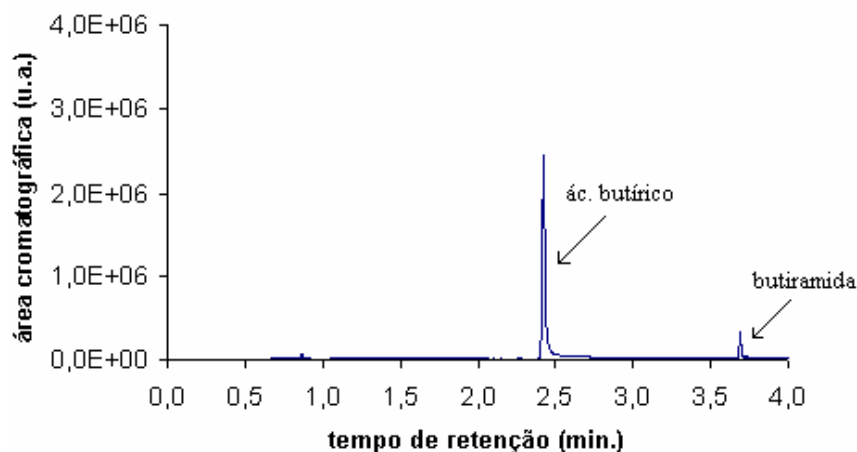


Figura 21 - Cromatograma do ácido butírico obtido por hidrólise da butiramida.

u.a. unidades arbitrárias.

Pela análise dos cromatogramas, pode-se concluir que a quantidade de enzima adicionada às amidas não foi suficiente para hidrolisar toda a quantidade de amida adicionada, pois ainda foi detectado uma pequena quantidade de propionamida e de butiramida que não foram hidrolisadas. A produção dos ácidos carboxílicos permitiu confirmar a acção desta enzima sobre os substratos usados, mesmo num curto espaço de tempo (15 min.).

3.2.3 Ensaio com culturas de *H. pylori* obtidas a partir de um isolado clínico

3.2.3.1 Estabilidade das amidas à autoclavagem

Antes de iniciar os ensaios com as culturas de *H. pylori*, obtidas a partir de um isolado clínico, foi verificada a estabilidade das amidas à pressão e à temperatura da autoclavagem. As amidas foram sujeitas à autoclavagem nos frascos de SPME. Após a autoclavagem, os frascos foram arrefecidos e analisados aplicando a metodologia de SPME/GC-MS em modo de detecção Fullscan.

Obtiveram-se cromatogramas que mostraram a presença das duas amidas, não tendo sido detectado a presença de nenhum dos ácidos. A Figura 22 mostra o

cromatograma da butiramida obtido após a autoclavagem do frasco de SPME contendo a amida.

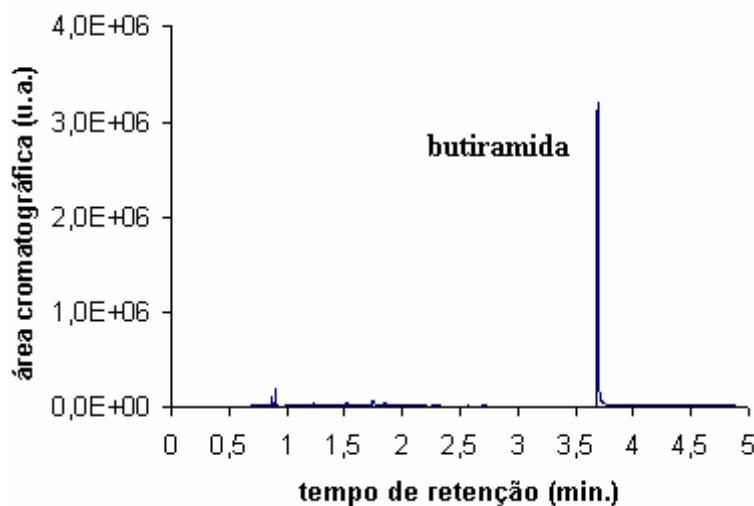


Figura 22 - Cromatograma obtido após autoclavagem do meio de cultura com a butiramida.

u.a. unidades arbitrárias.

3.2.3.2 Detecção dos ácidos produzidos pela *H. pylori*

Para detectar os ácidos propiónico e butírico produzidos pela amidase bacteriana, através da hidrólise da propionamida e da butiramida foram feitos quatro ensaios com culturas de *H. pylori*. Em todos os ensaios foram detectados os dois ácidos, embora não tivesse sido possível quantificar a quantidade de ácidos produzidos em alguns dos ensaios.

A Figura 23 mostra o cromatograma obtido num dos ensaios com as culturas de *H. pylori* na presença das duas amidas, que foram adicionadas em simultâneo. É possível observar um pico correspondente ao ácido propiónico e outro correspondente ao ácido butírico.

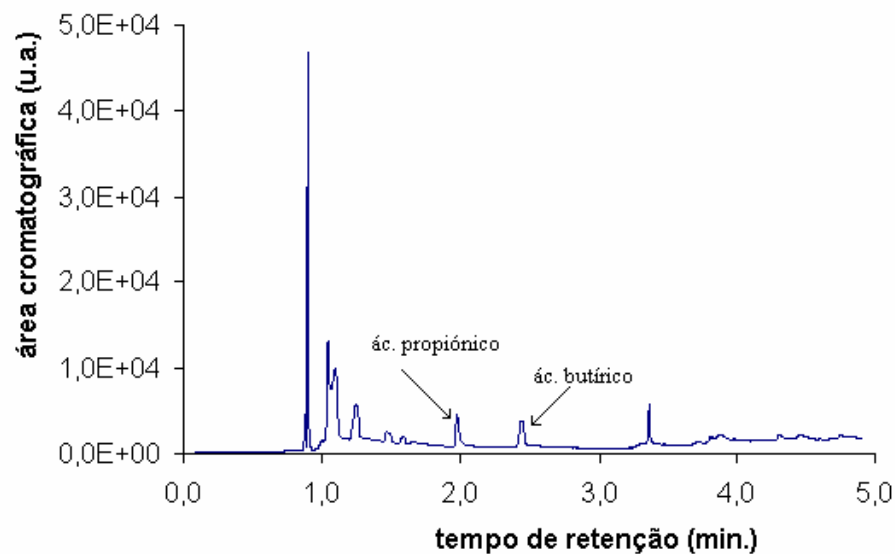


Figura 23 - Cromatograma dos ácidos produzidos a partir de culturas de *H. pylori*.

u.a. unidades arbitrárias.

As Tabela 12 e 13 apresentam os resultados obtidos nos ensaios, mostrando a média das áreas cromatográficas obtidas e as respectivas quantidades de ácidos propiónico e butírico produzidas após a adição das amidas às culturas bacterianas. A quantificação do teor de ácidos produzidos foi feita com base nas curvas de calibração externa elaboradas para o ácido propiónico e butírico no sistema de três fases.

Tabela 12 - Produção de ácido propiónico pela *H. pylori* após adição de propionamida.

| Ensaio | Réplica | Quantidade de propionamida (g/L) | Tempo de exposição (minutos) | Área (u.a. ^a , 10 ⁵) | Quantidade de ácido propiónico (µg) | Rendimento (%) |
|-----------|---------|----------------------------------|------------------------------|---|-------------------------------------|----------------|
| A1 | 1 | 1,5 | 1440 | 4,9 | 278 | 37,5 |
| | 2 | 1,5 | 1440 | 12,0 | 567 | 76,6 |
| | 3 | 1,5 | 1440 | 14,0 | 636 | 86,0 |
| A2 | 1 | 1,5 | 1440 | 1,4 | < LOQ ^b | - |
| | 2 | 1,5 | 1440 | 2,2 | 172 | 23,2 |
| | 3 | 1,5 | 1440 | 2,5 | 184 | 24,9 |
| B | 1 | 1,5 | 60 | 0,4 | < LOQ | - |
| | 2 | 1,5 | 60 | 0,3 | < LOQ | - |
| | 3 | 1,5 | 60 | 0,6 | < LOQ | - |
| C | 1 | 15,0 | 30 | 2,2 | 170 | 2,3 |
| | 2 | 15,0 | 30 | 2,4 | 178 | 2,4 |
| | 3 | 15,0 | 30 | 4,4 | 256 | 3,5 |

a) u.a. unidades arbitrárias; b) LOQ limite de quantificação.

Tabela 13 - Produção de ácido butírico pela *H. pylori* após adição de butiramida.

| Ensaio | Réplica | Quantidade de butiramida (g/L) | Tempo de exposição (minutos) | Área (u.a. ^a , 10 ⁵) | Quantidade de ácido butírico (µg) | Rendimento (%) |
|-----------|---------|--------------------------------|------------------------------|---|-----------------------------------|----------------|
| A1 | 1 | 1,7 | 1440 | 5,3 | 294 | 39,7 |
| | 2 | 1,7 | 1440 | 6,0 | 266 | 36,0 |
| | 3 | 1,7 | 1440 | < LOD ^b | - | - |
| A2 | 1 | 1,7 | 1440 | 0,2 | < LOQ ^c | - |
| | 2 | 1,7 | 1440 | < LOD | - | - |
| | 3 | 1,7 | 1440 | < LOD | - | - |
| B | 1 | 1,7 | 60 | 0,1 | < LOQ | - |
| | 2 | 1,7 | 60 | 0,5 | < LOQ | - |
| | 3 | 1,7 | 60 | 0,7 | < LOQ | - |
| C | 1 | 17,5 | 30 | 0,2 | < LOQ | - |
| | 2 | 17,5 | 30 | 0,2 | < LOQ | - |
| | 3 | 117,5 | 30 | 0,3 | < LOQ | - |

a) u.a. unidades arbitrárias; b) LOD limite de detecção; c) LOQ limite de quantificação.

No ensaio **A1**, onde foram adicionados as duas amidas ao meio de cultura, e estas permaneceram em contacto com a bactéria durante 1440 minutos (24 horas), obteve-se uma área cromatográfica de $10,4 \times 10^5$, sendo a quantidade de ácido propiónico correspondente a 67 % da quantidade de amida adicionada. A área cromatográfica do ácido butírico foi de $5,7 \times 10^5$, sendo a quantidade do ácido de 38% da quantidade de butiramida adicionada, não se tendo detectado a produção de ácido butírico numa das réplicas.

No ensaio **A2** detectou-se a produção de ácidos, mas em quantidades muito inferiores, tendo sido obtidas áreas cromatográficas de $2,0 \times 10^5$ correspondente a 24% para o ácido propiónico, não tendo sido possível quantificar o valor de ácido propiónico produzido numa das réplicas por estar abaixo dos limites de quantificação. O ácido butírico foi detectado numa das réplicas, mas a sua quantificação não foi possível.

Entre os ensaios **A1** e **A2** observaram-se diferenças de produção de ácidos, o que pode ser explicado pela menor concentração bacteriana das culturas no ensaio **A2**.

No ensaio **B**, onde se diminuiu o tempo de contacto das amidas com a bactéria para 60 minutos, foram detectados os dois ácidos em todas as réplicas, obteve-se uma área cromatográfica de $0,40 \times 10^5$ para o ácido propiónico e para o ácido butírico obteve-se uma área de $0,43 \times 10^5$, a quantificação da produção de ácidos neste ensaio não foi possível.

No ensaio **C**, onde se adicionaram as amidas numa quantidade 10 vezes superior à anterior, mas com diminuição do tempo de exposição da bactéria às amidas para 15 minutos, obteve-se uma área cromatográfica de $3,0 \times 10^5$, com uma produção de ácido propiónico de 2,7%. A área cromatográfica para ácido butírico foi de $0,2 \times 10^5$, a quantificação da produção do ácido não foi possível.

Pelos dados das Tabela 12 e 13, pode-se verificar que, em todos os ensaios, a percentagem de ácido propiónico produzido é superior à percentagem do ácido butírico, podendo-se concluir que a amidase da *H. pylori* é duas a três vezes mais activa sobre a propionamida do que sobre a butiramida.

A produção de ácidos no ensaio **A** apresentou um bom rendimento que pode ser explicado pelo maior tempo de exposição que foi de 24h. A quantidade de ácido propiónico obtida com o tempo de 30 minutos é suficiente para ser quantificada de acordo com os limites de quantificação do método.

A curva de calibração no sistema de duas fases tem limites de quantificação menores que o sistema de três fases, o que mostra a aplicabilidade da metodologia na análise de quantidades muito baixas destes compostos no ar exalado.

Foram também realizados três ensaios em branco. O primeiro ensaio compreendeu a análise ao meio de cultura sem adição das amidas, no qual não foi detectado nenhum dos ácidos. Ao segundo ensaio foram adicionadas as amidas ao meio de cultura, não tendo sido, também detectado nenhum dos ácidos. Por último, o terceiro ensaio, analisou o meio de cultura líquido com a bactéria, também não foi detectado nenhum dos ácidos. A Figura 24 mostra um dos ensaios em branco obtido após adição das amidas ao meio de cultura líquido sem as bactérias. Estes resultados indicam que só ocorre formação dos ácidos carboxílicos quando as bactérias estão na presença das amidas.

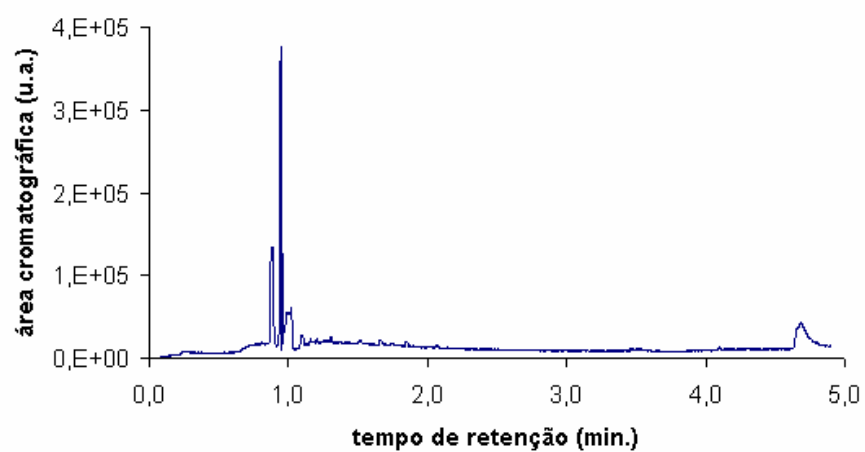


Figura 24 - Cromatograma em branco obtido após adição das amidas ao meio de cultura.

u.a. unidades arbitrárias.

4 CONCLUSÕES

Este trabalho propõe um processo de detecção dos ácidos propiónico e butírico em culturas de *H. pylori* através da utilização de amidas alifáticas, a propionamida e a butiramida. Estas amidas alifáticas em contacto com o meio onde esteja presente a bactéria são convertidas nos ácidos alifáticos correspondentes, no ácido propiónico e no ácido butírico. Estes ácidos são compostos voláteis que podem ser detectados e quantificados na fase de vapor pela metodologia desenvolvida, a microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Neste trabalho começou-se por otimizar a metodologia de SPME/GC-MS, tendo sido seleccionada a fase estacionária mais adequada para estudar os ácidos propiónico e butírico. Concluiu-se que dos três tipos de fibras estudadas, a fibra CW/DVB, por ser uma fibra do tipo mista, indicada para álcoois e compostos polares (MW 40-275) e por conter macro, meso e microporos é a mais apropriada para detectar os ácidos carboxílicos [43]. Pelos resultados obtidos verifica-se uma maior eficiência de extração, traduzida por maiores áreas cromatográficas.

O estudo do volume de amostra permitiu concluir que, para a mesma concentração dos ácidos, quando se usam volumes de 2,5 mL, 12,5 mL e 25 mL, as áreas cromatográficas são 3 a 5 vezes superiores às obtidas para o volume de 0,05 mL. Os volumes responsáveis pelas maiores áreas cromatográficas não apresentam diferenças significativas entre elas, verificando-se um fenómeno de saturação da fase estacionária. O conhecimento do estado de saturação da fibra deve ser tido em consideração quando se realizam análises quantitativas por SPME/GC-MS.

O ensaio com a amidase comercial mostrou que as amidas alifáticas de cadeia curta utilizadas são um substrato adequado, tal como comprovado pela detecção dos ácidos carboxílicos correspondentes.

As amidas usadas no estudo não sofreram hidrólise quando submetidas à pressão e temperatura da autoclavagem. Assim, puderam ser usadas nas culturas bacterianas como substratos.

Nos ensaios com culturas de *H. pylori*, obtidas a partir de um isolado clínico, verificou-se que após adição de propionamida e/ou de butiramida ao meio de cultura contendo a bactéria, ocorre a formação dos respectivos ácidos, que passam para a fase de vapor em quantidades que permitem a sua detecção e quantificação por GC-MS. Verificou-se que a amidase da *H. pylori* é duas a três vezes mais activa sobre a propionamida do que

sobre a butiramida, não tendo sido necessário mais do que 20 mM (1,5 g/L para a propionamida e 1,7 g/L para a butiramida) de cada uma das amidas para se detectarem os ácidos.

Estes ensaios demonstraram que o tempo de exposição das amidas com as culturas influencia a produção dos ácidos. Quando a mesma quantidade de amida permanece durante mais tempo em contacto com a bactéria, obtêm-se maiores áreas cromatográficas e portanto, maior quantidade de ácido produzido. Foi demonstrado que quando se aumenta a concentração das amidas a produção de ácidos aumenta.

Também foi demonstrado que no meio de cultura contendo a *H. pylori*, sem adição de amidas não existe a produção destes ácidos carboxílicos, podendo-se concluir que apenas quando se tem simultaneamente a *H. pylori* e uma amida alifática é que ocorre a formação do ácido correspondente, por acção da amidase bacteriana.

A detecção dos ácidos carboxílicos, o ácido propiónico ou o ácido butírico, por aplicação da metodologia ao estudo do ar exalado, pode permitir desenvolver um teste de diagnóstico para a infecção por *H. pylori*. Este método de diagnóstico proporcionará um teste não invasivo, rápido, sensível e possivelmente mais barato que as alternativas actualmente existentes no mercado.

A utilização de um sistema de duas fases em modo de detecção SIM, que se assemelha à análise do ar exalado, poderá aumentar a sensibilidade da metodologia quando comparado com testes realizados em solução (sistema de três fases).

Perspectivas futuras

Num trabalho futuro seria importante testar a metodologia desenvolvida em indivíduos, com o objectivo de produzir um teste diagnóstico para a infecção por *H. pylori*. A metodologia SPME/GC-MS seria aplicada ao estudo comparativo entre uma população com a infecção por *H. pylori* e uma população saudável (população controlo).

No entanto, antes deste estudo comparativo seria importante testar vários parâmetros, como verificar se as amidas e/ou os ácidos são metabolizados, por exemplo pelo fígado; compreender o que acontece nas trocas gasosas a nível alveolar, de forma a perceber se os ácidos são libertados pelo ar exalado e ainda escolher uma amida que não

apresente toxicidade. Se estes parâmetros testados fossem favoráveis podia-se então, avançar para o estudo das populações.

O procedimento para testar a metodologia desenvolvida neste trabalho consistiria em administrar uma das amidas alifáticas estudadas aos indivíduos. A amida, em contacto com o meio onde a *H. pylori* esteja presente é convertida no ácido carboxílico correspondente, por acção da amidase bacteriana. Estes ácidos carboxílicos, compostos voláteis, poderiam ser identificados e quantificados na fase de vapor pela metodologia de SPME/GC-MS. Assim, após a ingestão da amida pelos indivíduos, aguardava-se cerca de 15 minutos, em seguida o ar exalado seria recolhido para um saco adequado e os compostos do ar seriam analisados. Se o ácido carboxílico, correspondente à amida administrada, fosse detectado no ar exalado indicaria a presença da *H. pylori* no estômago, diagnosticando facilmente a infecção.

5 BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Brown, L. M. (2000) *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Rev. Epidemiol.*, 22:283-297.
- [2] Kodaira, M. S.; Escobar, A. U.; Grisi, S. (2002) Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Rev. Saúde Pública*, 26:356-69.
- [3] Gerrits, M. M.; Vliet, A. H. M.; Kuipers, E. J.; Kusters, J. G. (2006) *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis.*, 6:699-709.
- [4] On, S. L. W. (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.*, 90:1S-15S.
- [5] Kusters, J. G.; Vliet, A.H.M.; Kuipers, E. J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev. Clin. Microbiol.*, 19:449-490.
- [6] Dunn, B. E.; Cohen, H.; Blaser, M. J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Rev. Clin. Microbiol.*, 10:720-741.
- [7] Dubois, A. (1995) Spiral Bacteria in the Human stomach: the Gastric Helicobacters. *E. Infect. Dis.*, 1:79-88.
- [8] Versalovic, J. (2003) *Helicobacter pylori* Pathology and Diagnostic Strategies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 119:403-412.
- [9] Lamarque, D.; Peek, R.M. (2003) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 8:21-30.

- [10] Mattos, L.; Cintra, J.; Sanches, F.; Silva, R.; Ruiz, M.; Moreira, H. (2002) ABO, Lewis, secretor and non-secretor phenotypes in patients infected or uninfected by the *Helicobacter pylori* bacillus. *Rev. Paul. Med.*, 120:55-58.
- [11] Das J.C.; Paul N. (2007) Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian J. Pediatr.*, 74:287-290.
- [12] Pflock, M.; Finsterer, N.; Joseph, B. (2006) Characterization of the ArsRs regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J. Bacteriol.*, 188:3449-3462.
- [13] Vliet, A. H. M.; Kuipers, E. J.; Stoof, J.; Poppelaars, S. W.; Kusters, G. (2004) Acid-responsive Gene Induction of Ammonia-Producing Enzymes in *Helicobacter pylori* is Mediated via a Metal-Responsive Repressor Cascade. *Infect. Immun.*, 72:766-773.
- [14] Skouloubris, S.; Labigne A.; Reuse H. (2001) The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. *Mol. Microbiol.*, 40:596-609.
- [15] Azevedo, N. (2006) Survival of *Helicobacter pylori* in drinking water and associated biofilmes. Tese de Doutorado, Universidade do Minho.
- [16] Logan, R. P. H.; Walker, M. M. (2001) Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. Br. Med.*, 323:920-922.
- [17] Silva R.; Mota, R.; Costa, A. M. (1999) Prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* em crianças. *ArquiMed.*, 13:27-30.
- [18] Perez-Perez, G. I., Rothenbacher D., Brenner H., (2004) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 9:1-6.

-
- [19] Perry, S.; Sanchez, M. L.; Yang, S. (2006) Gastroenteritis and Transmission of *Helicobacter pylori* infection in Households. *E. Infect. Dis.*, 12:1701-1708.
- [20] Canete, A.; Abunaji, Y. (2003) Breath Test Using A Single 50-mg Dose of ^{13}C -Urea to Detect *Helicobacter pylori* Infection in Children. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutrition*, 36:105-111.
- [21] Gisbert, J. P.; Pajares, J. M. (2005) ^{13}C -Urea breath test in the management of *Helicobacter pylori* infection. *J. Gen. Microbiol.*, 654:1-8.
- [22] Ohara, S.; Kato, M.; Asaka, M.; Toyota, T. (1998) Studies of ^{13}C -urea breath test for diagnostic of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J. Gastroenterol.*, 33:6-13.
- [23] Bumann, D.; Jungblut, P. R.; Meyer, T. F. (2004) *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. *Proteomics*, 4:2843-2848.
- [24] Rocha, S. M.; Coutinho, P.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. (2006) Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature. *J. Chromatogr. A*, 1114:188-197.
- [25] Nunes, C.; Rocha S. M.; Saraiva J.; Coimbra M. A. (2006) Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). *Carbohydr. Polym.*, 64:306-311.
- [26] Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. (2001) Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. *J. Agric. Food Chem.*, 49:5142-5151.

- [27] Musteata, F. M.; Musteata, M. L.; Pawliszyn, J., (2006) Fast *in vivo* Microextraction: a new tool for clinic analysis. *Clin. Chem.*, 52:4.
- [28] Musteata, F. M.; Pawliszyn, J. (2007) Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 26:36-44.
- [29] Francesco, F. D.; Fuoco, R.; Trivella, M.G.; Ceccarini, A. (2005) Breath analysis: trends in techniques and clinical applications. *Microchem. J.*, 79:405-410.
- [30] Parreira V. F., Cardeal Z. L. (2005) Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de SPME. *Quim. Nova*, 28:646-654.
- [31] Kataoka, H. (2005) Recent Advances in SPME and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *Curr. Pharmacol. Anal.*, 1:65-84.
- [32] Rocha, S.; Coutinho, P.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. (2007) Headspace-solid phase microextraction-gas chromatography as a tool to define an index that establishes the retention capacity of the wine polymeric fraction towards ethyl esters. *J. Chromatogr. A*, 1150:155-161.
- [33] Pizarro, C.; Esteban-Díez, I.; Sáenz-González, C.; González-Sáiz, J.M. (2008) Vinegar classification based on feature extraction and selection from headspace solid-phase microextraction/gas chromatography volatile analyses: A feasibility study. *Anal. Chem. Acta*, 608:38-47.
- [34] Vas, G.; Vékey, K. (2004) Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, 39:233-254.
- [35] Lord, H. L.; Pawliszyn, J. (2000) Evolution of Solid-phase microextraction Technology. *J. Chromatogr. A*, 885:153-193.

-
- [36] Pawliszyn, J. (2000) Theory of solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 38:270-278.
- [37] Górecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J. (1999) Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst.*, 124:643-649.
- [38] Zhang, Z.; Pawliszyn, J. (1993) Headspace Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.*, 65:1843-1852.
- [39] Arthur, C. L.; Killam, L. M.; Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. (1992) Automation and Optimization of Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.*, 62:1960-1966.
- [40] Alpendurada, F. M. (2000) Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 889:3-14.
- [41] Pawliszyn, J. (1997) *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice SPME*. Wiley-VCH, New York.
- [42] Kitson, F. G.; Larsen, B. S.; McEwen, C. N. (1996) *Gas chromatography and Mass spectrometry. A practical guide*, Academic Press, Capítulos 1 e 3.
- [43] Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. (2006) Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening. *Anal. Chim. Acta*, 563:204-214.